



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO



ESCOLA DE FARMÁCIA

VIVIAN MAGALHÃES FREITAS SILVA

Potenciais inibidores da cruzaina: tentativa de síntese de unidades estruturais chave para obtenção do MB15 e seus análogos

OURO PRETO

2023

VIVIAN MAGALHÃES FREITAS SILVA

Potenciais inibidores da cruzaina: tentativa de síntese de unidades estruturais chave para obtenção do MB15 e seus análogos

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado como parte das exigências para obtenção do título de Bacharel em Farmácia pela Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

Orientador: Prof. Dr. Saulo Fehelberg Pinto Braga

OURO PRETO

2023

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

S586p Silva, Vivian Magalhaes Freitas.
Potenciais inibidores da cruzaina [manuscrito]: tentativa de síntese de unidades estruturais chave para obtenção do MB15 e seus análogos. / Vivian Magalhaes Freitas Silva. - 2023.
75 f.: il.: color., tab..

Orientador: Prof. Dr. Saulo Fehelberg Pinto Braga.
Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Chagas, Doença de. 2. Trypanosoma cruzi. 3. Cisteína Proteases. 4. Ressonância magnética nuclear. I. Braga, Saulo Fehelberg Pinto. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 616.937

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza- SIAPE: 1.763.787



FOLHA DE APROVAÇÃO

Vivian Magalhães Freitas Silva

Potenciais inibidores da cruzaina: tentativa de síntese de unidades estruturais chave para obtenção do MB15 e seus análogos

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia

Aprovada em 29 de agosto de 2023

Membros da banca

Dr. Saulo Fehelberg Pinto Braga - Orientador (Universidade Federal de Ouro Preto)
Dra. Adriana Cotta Cardoso Reis (Universidade Federal de Ouro Preto)
Ms. Rúbia Castro Fernandes Melo Reis (Universidade Federal de Ouro Preto)

Dr. Saulo Fehelberg Pinto Braga, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 29/08/2023



Documento assinado eletronicamente por **Saulo Fehelberg Pinto Braga, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 29/08/2023, às 16:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0582729** e o código CRC **19301577**.

“Dedico este trabalho a minha avó Elza Ferreira da Silva (*in memoriam*), que constantemente me motivou a perseguir meus sonhos e sempre vibrou pelas minhas conquistas.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela saúde e força para chegar até o final. Aos meus pais, Janete e Wlamir, meu irmão Wlamir Jr. e aos familiares pelo carinho e apoio durante todos esses anos.

A todos do LQMB que me ajudaram desde o início compartilhando suas experiências, em especial a Rúbia, Vinícius, Adriana, Iris, Talita, Iza e Amanda, e aos amigos que a graduação me proporcionou, Leticia, Grazi e Ayron, passamos por inúmeros desafios, mas juntos vivemos momentos de muita alegria, fazendo valer a pena toda a jornada.

A todos os professores que contribuíram para essa caminhada, especialmente ao Thiago pelos ensinamentos e ao Saulo pela orientação, paciência, confiança e parceria durante esses anos de dedicação no projeto de pesquisa.

A todos que me acolheram em Ouro Preto e me proporcionaram momentos inesquecíveis. Por todo carinho que recebi da República Fogo de Palha, obrigada por me abraçarem. Aos amigos da vida, que mesmo longe contribuíram para essa conquista. Por fim, agradeço a Universidade Federal de Ouro Preto por ter sido fonte de conhecimento, onde me tornei parte da história dos alunos da gloriosa Escola de Farmácia.

Gratidão!

RESUMO

A doença de Chagas representa um sério problema de saúde pública, levando a mais de 12.000 mortes anualmente e afetando entre 6 e 7 milhões de indivíduos devido à infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, o agente causador. O Brasil se destaca como o segundo país em número de infectados (1,9 milhão). A inadequação do atual arsenal terapêutico ressalta a necessidade crucial de desenvolver fármacos mais eficazes e menos tóxicos para o tratamento dessa enfermidade. A cruzaina, principal cisteína protease do *T. cruzi*, é vital para a sobrevivência do parasita e é um alvo molecular validado na busca por agentes tripanocidas. O MB15, um inibidor não peptídico e não covalente, se destaca entre os inibidores de cruzaina descobertos (CI₅₀ de 5 µM), também demonstrando efeito *in vitro* contra o *T. cruzi* (CI₅₀ 32 µM). Sua estrutura única o torna um candidato inovador na exploração de novos inibidores permitindo modificações em múltiplos pontos da molécula, visando estabelecer uma correlação entre estrutura e atividade, a fim de gerar análogos mais potentes. Uma triagem virtual conduzida por nosso grupo de pesquisa identificou diversos análogos do MB15 com potencial atividade contra a cruzaina. Esses análogos possuem variações estruturais na porção 3,4-difluorofenila do MB15 e no grupo amida. O presente trabalho propôs a síntese e caracterização por Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C de intermediários estruturais do MB15, planejados a partir de sua análise retrossintética e variação dos substituintes nos reagentes de partida. No entanto, inúmeras tentativas de síntese foram realizadas para formação de fenolamidas sem que os produtos fossem obtidos em quantidade e pureza satisfatória para viabilizar as próximas etapas, ainda que utilizando condições de reação diversas. Em contraste, a etapa de aminação redutiva mostrou resultados promissores. Apesar desse relativo insucesso, este trabalho serviu para conhecer as limitações na obtenção desses intermediários-chave e estabelecer as melhores condições de reação, abrindo caminho para prosseguir com a obtenção de análogos do MB15 como potenciais candidatos à fármacos tripanocidas.

Palavras-chave: Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, cruzaina, MB15, aminação redutiva, amidas.

ABSTRACT

Chagas disease represents a serious public health issue, leading to over 12,000 deaths annually and affecting between 6 to 7 million individuals due to infection by *Trypanosoma cruzi*, its causative agent. Brazil stands out as the second country in terms of the number of infected individuals (1.9 million). The inadequacy of the current therapeutic arsenal underscores the crucial need to develop more effective and less toxic drugs for treating this ailment. Cruzain, the primary cysteine protease of *T. cruzi*, is vital for the parasite's survival and is a validated molecular target in the search for trypanocidal agents. MB15, a non-peptidic and non-covalent inhibitor, stands out among discovered cruzain inhibitors (IC₅₀ of 5 μM), also demonstrating *in vitro* effect against *T. cruzi* (IC₅₀ 32 μM). MB15 boasts a unique structure, making it an innovative candidate in exploring new inhibitors. Its structural characteristics allow modifications at multiple points in the molecule, aiming to establish a correlation between structure and activity to generate more potent analogs. A virtual screening conducted by our research group identified several MB15 analogs with potential activity against cruzain. These analogs carry out structural variations in the 3,4-difluorophenyl and amide portion of MB15. This study proposed the synthesis and characterization by ¹H and ¹³C Nuclear Magnetic Resonance of key structural intermediates of MB15, designed based on its retrosynthetic analysis and variation of substituents in the starting reagents. However, numerous synthesis attempts for the formation of phenolamides resulted in unsatisfactory product quantities and purity to be used in the next steps, even under various reaction conditions. In contrast, the reductive amination step showed more promising results. Despite this relative lack of success, this work was necessary to uncover the reactions limitation and to establish the best reaction conditions, paving the way to the obtention of MB15 derivatives as potential trypanocidal drug candidates.

Keywords: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, cruzain, MB15, reductive amination, amides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição mundial de casos de doença de chagas.....	15
Figura 2: Transmissão vetorial da DC	17
Figura 3: Estrutura do benznidazol (A) e nifurtimox (B).....	20
Figura 4: Estrutura do MB15 (3-cloro-4-((1-(3,4-difluorobenzil)piperidin-4-il)oxi)- <i>N</i> -(2-metoxietil)benzamida)	23
Figura 5: Análise retrossintética do MB15.....	33
Figura 6 : Estrutura do MB15 evidenciando os intermediários propostos	34
Figura 7: Rota de síntese para obtenção das substâncias propostas	34
Figura 8: Método convencional de formação de amidas. Envolve a ativação do ácido carboxílico por um grupo ativante (A*), seguido de um ataque nucleofílico da amina gerando uma ligação amida na presença de um reagente de acoplamento, base e solvente.....	36
Figura 9: Obtenção das amidas pela formação de um cloreto de ácido	36
Figura 10: Proposta de mecanismo A para reação de acilação/formação do cloreto de ácido e B para reação de formação da amida	38
Figura 11: Ativação com DMF: ciclo catalítico	40
Figura 12: Proteção da hidroxila fenólica pela formação de um éster..	41
Figura 13: Espectro de RMN de ¹ H do produto obtido na reação de proteção da hidroxila fenólica	42
Figura 14: Espectro de RMN de ¹³ C do produto obtido na reação de proteção da hidroxila fenólica.....	42
Figura 15: Estratégia alternativa para a formação de amida a partir do ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico, envolvendo a proteção e regeneração da hidroxila fenólica.....	43
Figura 16: Proposta de mecanismo para formação do éster ativado (A) com subsequente formação da amida (B).	46
Figura 17: Proposta de mecanismo de formação da <i>N</i> -acilureia e hidrólise da <i>O</i> -acilisourea.....	47
Figura 18: Proposta de mecanismo da formação da amida mediada por EDC e NHS.....	48
Figura 19: A condensação mediada pelo propiolato de metila.....	49
Figura 20: Formação de ligação de amida mediada por TCT entre o ácido carboxílico e aminas em solventes eutéticos profundos..	49
Figura 21: Rota de síntese para formação do éter benzílico a partir do cloreto de benzila.	50
Figura 22: Rota de síntese para a obtenção da 4-hidroxibenzilpiperidinas a partir de diferentes aldeídos aromáticos.	51

Figura 23: Sequência de intermediários formados no processo de aminação reductiva.....	51
Figura 24: Proposta A: Mecanismo da primeira etapa da reação de aminação reductiva na presença de um ácido e B: Atuação simplificada do reagente NaBH ₄ para redução da imina formada na etapa anteriormente	53
Figura 25: Mecanismo proposto para redução de carbonilados com NaBH ₄ . Fonte: ALVES e	55
Figura 26: Espectro de RMN de ¹ H do álcool benzílico.	57
Figura 27: Espectro de RMN de ¹³ C do álcool benzílico	58
Figura 28: Espectro de RMN de ¹ H da 1-(3,4-difluorbenzil)piperidin-4-ol.....	59
Figura 29: Espectro de RMN de ¹³ C da 1-(3,4-difluorbenzil)piperidin-4-ol.	60
Figura 30: Subespectro DEPT-135 da 1-(3,4-difluorbenzil)piperidin-4-ol.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Quantidades dos reagentes utilizados para obtenção do 4-metoxibenzoato de metila	27
Tabela 2: Quantidades dos reagentes utilizados para obtenção da N-benzilpropan-2-amina ..	28
Tabela 3: Quantidades dos reagentes utilizados para obtenção da 4-benzilmorfolina	30
Tabela 4: Quantidades dos reagentes utilizados para obtenção da 1-(3,4-difluorbenzil)piperidin-4-ol.....	31
Tabela 5: Resumo das melhores condições reacionais estabelecidas na reação de aminação reductiva	61

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Å	Angstrom
CAM	Solução de molibdato cérico amoniacal
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCS	Cromatografia em coluna de sílica
CI ₅₀	Concentração de um inibidor requerida para inibir a atividade de uma enzima em 50%
d	Dupleto
<i>d</i>	Densidade
DEPT	Intensificação por transferência de polarização sem distorção (D istortionless E nhancement by P olarization T ransfer)
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
EDC	Cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
<i>J</i>	Constante de acoplamento escalar spin-spin nuclear
m	Multiplete
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
OMS	Organização Mundial de Saúde
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	Simpleto
sl	Simpleto largo
SN ₂	Substituição nucleofílica bimolecular
t	Triplete
ta	Triplete aparente
THF	Tetra-hidrofurano

TMS	Tetrametilsilano
δ	Deslocamento químico

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Doença de Chagas.....	14
1.2	Epidemiologia.....	14
1.3	Transmissão e ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	16
1.4	Manifestações clínicas e diagnósticos.....	18
1.5	Tratamento atual e suas complexidades.....	19
1.6	O potencial da cruzaina como alvo molecular no tratamento da DC.....	22
2	OBJETIVOS.....	25
2.1	Objetivo Geral.....	25
2.2	Objetivos Específicos.....	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1	Síntese e caracterização das substâncias.....	26
3.2	Obtenção do 4-metoxibenzoato de metila.....	26
3.3	Obtenção da <i>N</i> -benzilpropan-2-amina.....	28
3.4	Obtenção da 4-benzilmorfolina.....	29
3.5	Obtenção e dados de caracterização da 1-(3,4-difluorbenzil)piperidin-4-ol.....	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1	Análise retrossintética do MB15.....	33
4.2	Obtenção de hidroxibenzilamidas intermediárias.....	35
4.3	Obtenção de benzilpiperidinas.....	50
5	CONCLUSÃO.....	62
	REFERÊNCIAS.....	63
	ANEXO I.....	70

INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas (DC) é uma patologia parasitária causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Foi descoberta em 1909 pelo médico e cientista brasileiro Carlos Chagas, ao encontrar um flagelo proveniente do tubo digestivo do inseto hematófago, popularmente conhecido como "barbeiro", enquanto atuava como pesquisador assistente do Instituto Oswaldo Cruz, no interior de Minas Gerais. As análises feitas em amostras coletadas provaram que o protozoário era capaz de infeccionar cobaias, ocasionando graves problemas de saúde e até mesmo a morte (COSTA et al., 2013; KAWAGUCHI, et al., 2019).

Encontrar evidências experimentais que comprovassem a relevância médico-social da doença de Chagas como um problema de saúde pública foi desafiador. Em 1935, o médico argentino Cecilio Romana contribuiu para o entendimento da enfermidade ao apresentar um indício clínico: o "sinal de Romana", um inchaço inflamatório nas pálpebras causado pela infecção da conjuntiva após o contato com as fezes ou urina contaminadas do triatomíneo, caracterizando a fase aguda da doença. Essa descoberta despertou o interesse de pesquisadores de outros países, que seguiram com suas investigações sobre a doença de Chagas. Somente na década de 1950, ela passou a ser reconhecida como um notável problema de saúde pública no Brasil (CHAO, et al., 2020).

1.2 Epidemiologia

Também conhecida como tripanossomíase americana, a DC é classificada como uma doença negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) devido ao baixo investimento em pesquisa para o desenvolvimento de novos fármacos, principalmente em países subdesenvolvidos onde a doença é prevalente (SANTOS, et al., 2022).

A DC é endêmica em 21 países, localizados principalmente na América Latina, resultando em aproximadamente 12 mil óbitos anuais (Figura 1). Estima-se que entre 6 e 7 milhões de indivíduos estejam atualmente infectados pela doença, e cerca de 75 milhões de pessoas estão expostas ao risco de contrair a infecção (GONÇALVES, et al., 2021). Além disso, cerca de 6

mil pessoas morrem no mundo, anualmente, em consequência das complicações da DC na fase crônica (BMC, 2023).

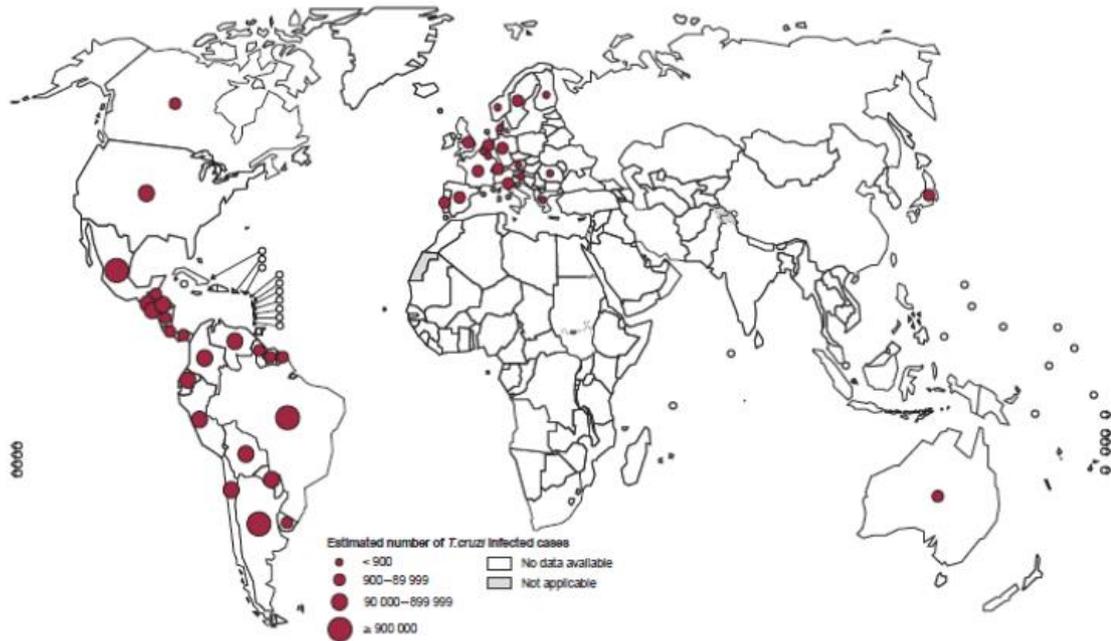


Figura 1: Distribuição mundial de casos de doença de chagas. Fonte: SILVA, et al. 2019.

No Brasil, a situação epidemiológica da DC passou por mudanças significativas na última década, impulsionadas por medidas de controle e alterações nos aspectos ambientais, sociais e econômicos. Durante o período de 2010 a 2019, foram registrados em média 4.541 óbitos por ano decorrentes da DC (BRASIL, 2022). Analisando somente o período de 2015 a 2019, foram registrados 1.744 novos casos de pacientes com DC, sendo a região Norte do país a que mais notificou a doença (DE SOUZA, et al., 2021).

Estima-se que aproximadamente 1,7% da população brasileira, equivalente a cerca de 3,5 milhões de indivíduos, esteja acometida pela doença (DE OLIVEIRA, et al., 2021). Na região Amazônica do Brasil, a forma aguda da DC por infecção oral, uma forma de transmissão não-vetorial, tem ganhado relevância, manifestando-se principalmente por meio de casos e surtos. De 2000 a 2013, foram registrados 1.034 casos de DC transmitida dessa forma, sendo a maioria desses casos associada a surtos relacionados à ingestão de alimentos, como açaí e carne de animais silvestres, como a capivara, contaminados com o *T. cruzi* (SANTOS, et al., 2018). Essa ocorrência revela um perfil epidemiológico peculiar, que difere das áreas tradicionalmente endêmicas. Dados do Ministério da Saúde do Brasil, entre 2008 e 2017, indicaram um aumento progressivo anual de casos de DC aguda por infecção oral. A maioria dos casos confirmados

(1.793 casos) ocorreu no estado do Pará, representando 82% do total (2.172 casos) (BRASIL, 2019).

No âmbito das doenças tropicais negligenciadas, Brasil, Argentina e México se destacam pela relevância no enfrentamento dessas enfermidades, sendo a DC um problema significativo nesses países e os posicionando como líderes em incidência, uma vez que possuem mais de 1 milhão de infectados. Entretanto, ao analisarmos a realidade na Colômbia e Venezuela, constatamos que essas nações também enfrentam um peso considerável em relação à DC, com aproximadamente 438 mil casos na Colômbia e 193 mil na Venezuela. Juntas, elas ocupam a quarta posição mundial em incidência da doença. Esses dados ilustram a extensão e a complexidade da disseminação da infecção na América do Sul, transcendendo fronteiras nacionais (ARNAL, et al., 2019; PARRA-HENAO et al., 2019).

Por outro lado, os países não endêmicos também apresentam um número significativo de pessoas infectadas. Nos Estados Unidos, a estimativa é de até 300 mil casos, enquanto na Europa há cerca de 72 mil, com a Inglaterra apresentando um número mais limitado de aproximadamente 12 mil infectados. Essa situação se agrava nos países que recebem uma grande migração, como a Espanha, que abriga o maior número de latino-americanos na Europa. Estima-se que cerca de 2,8% dos latino-americanos que vivem na Espanha possam ter a doença de Chagas (DE SOUZA MACÊDO et al., 2021; ALARCÓN DE NOYA et al., 2022).

Esses dados destacam a importância de abordar a doença de Chagas tanto em regiões endêmicas quanto em áreas onde ela se tornou uma preocupação emergente devido à migração e à globalização (Figura 1). É fundamental que sejam implementadas estratégias de prevenção, diagnóstico e tratamento adequado para combater efetivamente essa doença negligenciada (CHAO, et al., 2020).

1.3 Transmissão e ciclo de vida do *T. cruzi*

A transmissão do *T. cruzi* pode ocorrer através de diversas vias, que vão desde vetorial por insetos do gênero *Triatominae*, até as vias menos conhecidas, como a transmissão congênita, transfusional, oral e acidental (LANA, et al., 2005). A transmissão clássica da DC, conhecida como vetorial (Figura 2), ocorre principalmente por insetos triatomíneos, conhecidos como barbeiros, que são vetores da doença. No vetor, as formas tripomastigotas sofrem diferenciação

em epimastigotas, permitindo sua proliferação e posterior diferenciação para a forma tripomastigota metacíclica infectante. A contaminação se dá quando as fezes do barbeiro, contendo tripomastigotas metacíclicas, entram em contato com mucosas ou feridas na pele provocadas pela picada do inseto, sendo introduzidas no organismo ao indivíduo se coçar. As tripomastigotas então infectam as células do hospedeiro, onde se transformam em amastigotas intracelulares que se multiplicam ativamente. Posteriormente, se diferenciam novamente em tripomastigotas, que são liberadas na corrente sanguínea, podendo infectar novas células ou infectar triatomíneos que se alimentam do indivíduo infectado (GUARNER, 2019).

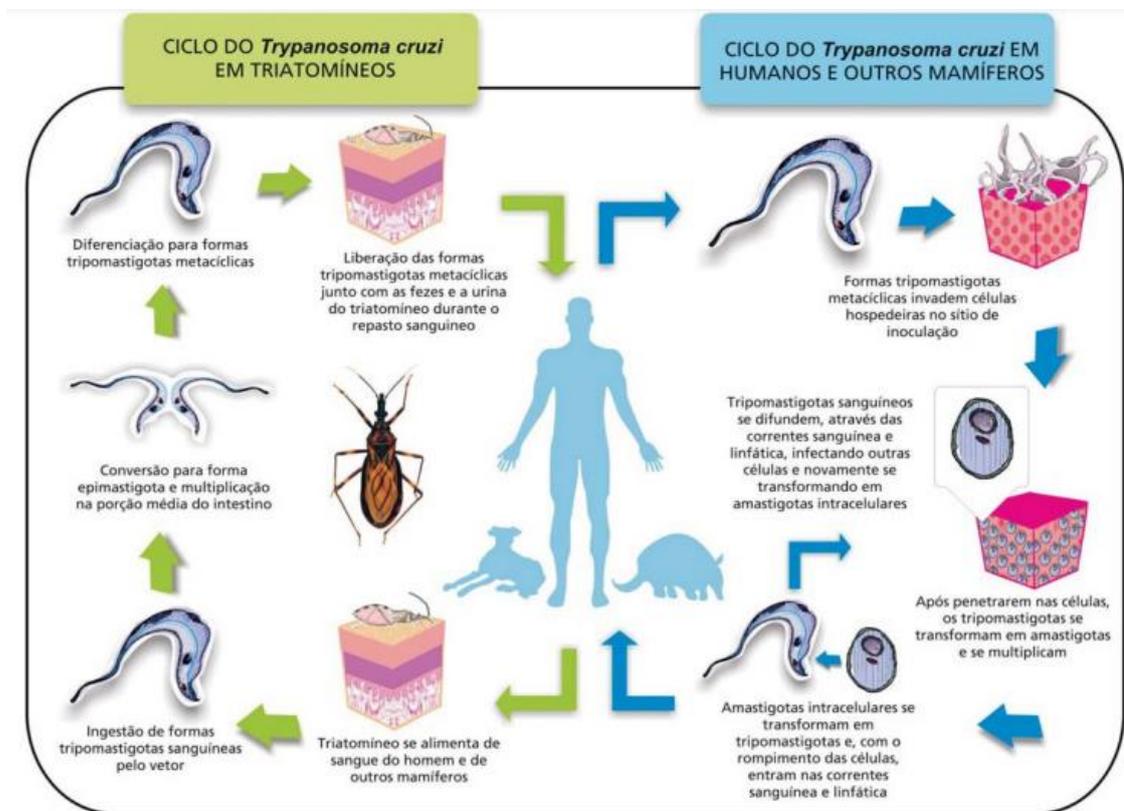


Figura 2: Transmissão vetorial da DC. Fonte: Infográfico Venício Ribeiro, ICICT/Fiocruz

Além da transmissão vetorial, outra forma de infecção é via transfusão sanguínea. Portadores da doença devem ser excluídos como doadores de sangue, mas a migração para áreas urbanas eleva a preocupação sobre a prevalência de doadores infectados nos hemobancos. A fase crônica da doença predomina nos diagnosticados, aumentando o risco transfusional (KAWAGUCHI, et al., 2019). No sangue, as tripomastigotas podem ser detectadas por exames laboratoriais e disseminarem a infecção para outros tecidos e órgãos do hospedeiro. Nos países não endêmicos, a transfusão sanguínea é a principal via de transmissão, devido à falta de triagem para o *Trypanosoma cruzi* (KAWAGUCHI, et al., 2019; GUARNER, 2019).

Outra via importante é a transmissão da doença pela via transplacentária, a principal forma de infecção congênita, podendo ocorrer também durante o parto, quando o feto entra em contato com o sangue infectado da mãe. Os mecanismos exatos da transmissão congênita ainda não são totalmente compreendidos, mas fatores como a carga parasitária e aspectos imunológicos nas mães afetadas podem estar relacionados. Sendo assim, o diagnóstico precoce é fundamental para iniciar o tratamento o mais cedo possível (LANA, et al., 2005).

A transmissão por via oral, ocorre quando há a ingestão de alimentos, como açaí e caldo de cana, que contenham triatomíneos infectados ou seus resíduos contendo uma carga parasitária. Além disso, a contaminação também pode advir da ingestão de carne de animais contaminados. Algumas pesquisas também apontam a presença do *T. cruzi* no leite materno durante a fase aguda da infecção, permitindo a transmissão pela amamentação. A entrada do parasita no corpo humano nesses casos se dá através da mucosa da boca (KAWAGUCHI, et al., 2019).

Ainda, pode-se citar a transmissão acidental em laboratórios, onde pesquisadores e técnicos podem se infectar ao manipular sangue de pacientes ou animais contaminados, e a transmissão por transplante de órgãos infectados, quando o paciente receptor pode desenvolver a fase aguda da doença devido à supressão imunológica causada pelos medicamentos utilizados antes e após o procedimento cirúrgico (DE ANDRADE, et al., 2011).

1.4 Manifestações clínicas e diagnósticos

A sintomatologia da doença varia de acordo com suas fases, que se subdividem em aguda e crônica. A fase aguda possui um período de incubação de 4 a 14 dias, pode ser assintomática ou apresentar sintomas leves como dores de cabeça, febre e palidez. Outros sinais, como o chagoma de inoculação caracterizado por um nódulo subcutâneo e o sinal de Romaña que dificulta a abertura das pálpebras, estão relacionados ao local da inoculação e auxiliam no diagnóstico clínico da doença (COURA, et al., 2014).

Durante a fase inicial da infecção, observa-se uma elevada quantidade de parasitas circulando no sangue e um amplo parasitismo nos tecidos, acompanhados por uma resposta imunológica intensa, caracterizando a fase aguda da infecção. Nesse caso o teste direto a fresco é uma opção de exame parasitológico que busca o parasita na forma de tripomastigota no sangue por microscopia óptica (LIMA, et al., 2019). Normalmente, o sistema imunológico do hospedeiro

é capaz de controlar a carga parasitária, porém não consegue eliminar completamente o parasita, resultando na progressão da infecção para a fase crônica da doença (FERNANDES, 2018).

A etapa de fase crônica dessa patologia tem início após 2-4 meses de infecção aguda. Nesse período os parasitas que antes eram perceptíveis na corrente sanguínea tornam-se localizados no coração e sistema digestivo, resultando em complicações mais graves como a cardiomiopatia, o megaesôfago e o megacólon, que vão caracterizar as diferentes manifestações da DC crônica (CORREIA, et al., 2021).

O indivíduo em fase crônica apresenta baixa parasitemia, sendo assim o diagnóstico é realizado somente por testes sorológicos de alta sensibilidade como por exemplo, o ELISA, técnica que detecta os anticorpos produzidos no corpo humano contra o parasita (LIMA, et al., 2019). A OMS recomenda a realização de pelo menos dois testes sorológicos com métodos distintos, com o objetivo de aumentar a confiabilidade do diagnóstico e evitando, assim, resultados falsos positivos ou falsos negativos. Em caso de resultados contraditórios, é indicado realizar um terceiro teste com outro princípio para garantir maior precisão no diagnóstico (GUEDES, et al., 2016).

1.5 Tratamento atual e suas complexidades

A quimioterapia da DC está restrita a apenas dois fármacos: benznidazol (Rochagan®, Radanil®, Roche) e nifurtimox (Lampit®, Bayer) (Figura 3). Ambos os tripanocidas, desenvolvidos entre 1960 e 1970, são amplamente utilizados no combate a infecções causadas por protozoários do gênero *Trypanosoma*, sendo que o benznidazol é melhor tolerado, mais amplamente disponível e possui mais suporte da literatura em termos de eficácia. Assim, o medicamento é preconizado pelo Ministério da Saúde, para o tratamento dos indivíduos infectados, principalmente as crianças (CORREIA, et al., 2021).

Entretanto, estudos prévios afirmam que cerca de 30% a 50% dos indivíduos submetidos a tratamentos tripanocidas relataram ocorrência de efeitos secundários indesejáveis. Os regimes de tratamento são longos, podendo variar entre 60-90 dias. Sendo assim, os pacientes podem sofrer com alguns sintomas relacionados à toxicidade dos medicamentos, como problemas digestivos, inflamação do fígado, danos aos nervos periféricos, leucopenia, perda de apetite, emagrecimento, náuseas, vômitos, dificuldades para dormir e irritações na pele. Tais reações

podem ser incapacitantes, levando ao ajuste ou mesmo à suspensão do tratamento, afetando adversamente a adesão dos pacientes ao protocolo terapêutico (LIMA, et al., 2019).

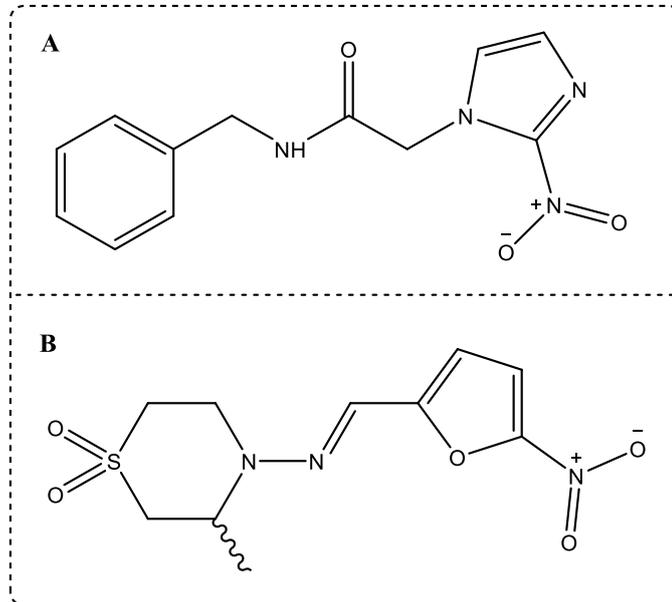


Figura 3: Estrutura do benznidazol (A) e nifurtimox (B) Fonte: Autora.

No Brasil o tratamento com benznidazol é fornecido gratuitamente pelas Secretarias Estaduais de Saúde a todos indivíduos diagnosticados com a forma aguda da doença, devendo ser iniciado assim que o diagnóstico é confirmado (LIMA, et al., 2019). Já os pacientes em fase crônica, o tratamento se aplica aos assintomáticos ou aqueles em fase clínica inicial. Caso o paciente apresente intolerância ao medicamento de primeira escolha, o nifurtimox também é disponibilizado como forma de tratamento alternativo (LIMA, et al., 2019; CORREIA, et al., 2021).

Estimativas de despesas em países, como Colômbia e México, apontam um custo entre 15 mil e 50 mil por ano em tripanocidas e acompanhamento clínico e laboratorial para cada paciente. Essa situação colabora com a baixa adesão ao regime de tratamento (MALONE, et al., 2021). Devido aos desconfortos intrínsecos à qualidade de vida, a DC perturba o equilíbrio do estilo de vida dos portadores. Importante lembrar que a forma cardíaca da doença é especialmente restritiva levando a limitações nas atividades cotidianas dos pacientes, comprometendo não apenas o bem-estar, mas também afetando a questão do trabalho e consequentemente o sustento dos pacientes (OLIVEIRA, et al., 2010).

Ainda hoje, não se teve avanços significativos na farmacologia destes medicamentos. Descobertos há mais de 50 anos, eles estão longe de serem considerados ideais. Isso ocorre porque ambos estão associados a sérios efeitos colaterais, alta toxicidade, desenvolvimento de resistência do parasito e, em muitos casos, demonstram ser ineficientes na fase crônica da doença, com uma taxa de cura de apenas 20% dos pacientes nessa fase (BERMUDEZ, et al., 2016).

Ambos os medicamentos são pró-fármacos, o que significa que eles precisam ser bioativados por enzimas. As enzimas nitrorredutases do parasita são responsáveis por essa biotransformação, que através de reações de redução em cascata geram metabólitos altamente reativos dos fármacos. Essas substâncias reagem com macromoléculas do parasita, interrompendo o metabolismo do *T. cruzi* e outras funções importantes, levando-o a morte celular (LASCANO, et al, 2022).

À medida que a doença entra em sua fase crônica, a eficácia dos medicamentos diminui, proporcionando ao parasita a oportunidade de evoluir para um estado de resistência. Essa resistência pode surgir devido à diminuição nos níveis da enzima nitrorredutase, bem como modificações genéticas que afetam seu sítio ativo (MARÍN, et al., 2020). O fato de o *T. cruzi* ser um parasito intracelular cria um desafio adicional para o desenvolvimento de novos medicamentos, uma vez que eles precisam ser capazes de atravessar a membrana plasmática celular do hospedeiro antes de agirem no parasita, levando à baixa eficiência do tratamento da DC (SILVA, 2021).

Considerando o exposto, torna-se essencial a busca por novos medicamentos que sejam mais eficazes e menos tóxicos no tratamento da DC. O desenvolvimento de uma terapia antiparasitária planejada, explorando alvos específicos em vias metabólicas cruciais para o parasito, é de grande importância (ETTARI, et al., 2016).

A exploração de tecnologias em nanoescala, tais como, nanopartículas poliméricas e nanoestruturas lipídicas, surge como uma abordagem promissora para aprimorar a solubilidade e a taxa de dissolução do benznidazol e nifurtimox. Isso poderia levar a reduções nas dosagens necessárias e possivelmente novas opções terapêuticas. No entanto, as formulações propostas carecem de investigação clínica até o momento (LASCANO, et al, 2022).

Nessa situação, uma alternativa é o desenvolvimento de novos fármacos com foco em alvos celulares que desempenham papéis essenciais para a sobrevivência do parasita. Extensivas pesquisas foram realizadas a fim de identificar e validar alvos moleculares para o *T. cruzi*, como foi o caso da CYP51 e a cruzafina (DA SILVA, et al., 2023).

A CYP51, também conhecida como esteroide 14 α -demetilase, emergiu como um alvo notável devido à sua relevância crítica para a sobrevivência do parasita, pois está relacionada à biossíntese do ergosterol, estrutura essencial para manter a integridade das membranas celulares. Junto à sua importância soma-se à disponibilidade de medicamentos antifúngicos que podem ser adaptados com facilidade para investigações clínicas no contexto da DC, uma vez que fármacos antifúngicos imidazólicos atuam em uma enzima homóloga em fungos (LASCANO, et al., 2022). O exemplo mais notável é o do posaconazol, amplamente utilizado no tratamento de infecções fúngicas. Estudos em modelos experimentais sugerem que o posaconazol, pode contribuir para prevenir ou reverter a cardiomiopatia chagásica crônica ao diminuir a fibrose nos tecidos cardíacos infectados. Essa abordagem potencialmente benéfica está associada a uma reorganização intrínseca do tecido miocárdico e a uma redução da carga parasitária, o que pode ter implicações significativas no tratamento da DC e na redução de danos cardíacos associados (NISIMURA, et al., 2020).

1.6 O potencial da cruzafina como alvo molecular no tratamento da DC

Desde 1995, McKerrow e colaboradores têm conduzido pesquisas com o objetivo de descobrir novas terapias antiparasitárias. Nesse contexto, eles empregam o desenho de fármacos, que utilizam informações sobre a estrutura molecular da proteína-alvo para desenvolver inibidores mais eficazes. Através de técnicas como cristalografia de raios-X e modelagem computacional, sítios específicos na proteína para a ligação dos compostos são identificados, possibilitando a concepção de fármacos direcionados ao tratamento de doenças específicas, como no caso de uma protease específica do *Trypanosoma cruzi*, denominada cruzafina (MCKERROW, et al., 1995).

Adicionalmente, a expressão e purificação dessas proteínas-alvo permite superar limitações de material parasitário, viabilizando a triagem de inibidores potenciais em bancos de dados químicos. O sequenciamento do genoma do *Trypanosoma cruzi*, causador da DC, desempenhou um papel significativo na identificação de alvos biológicos, especialmente enzimas, que estão

sendo investigados para o desenvolvimento de novos agentes anti-chagásicos (TURK, 2006). Essa combinação de tecnologias em biologia molecular tem permitido a rápida identificação de novos potenciais inibidores para o tratamento de parasitas (MCKERROW, et al., 1995).

A cruzaina destaca-se entre os alvos moleculares descobertos por ser a principal cisteíno protease do *T. cruzi*, presente em diversos compartimentos intracelulares do parasito e estar expressa em todos os estágios do seu ciclo de vida. Membro da família da papaína, a cruzaina catalisa as reações de hidrólise de ligações peptídicas. Mais especificamente, essa enzima é responsável pela decomposição de proteínas da célula hospedeira, o que é fundamental para o desenvolvimento da infecção (MOREIRA et al., 2014). Ainda, possui papel relevante na aquisição de nutrientes e evasão do sistema imunológico, mostrando-se um alvo molecular promissor para o desenvolvimento de fármacos tripanocidas (ROCHA, 2018).

A inibição da cruzaina é um desafio, e os modos de inibição e a natureza química dos inibidores de cisteíno proteases são amplamente debatidos. A maioria dos inibidores peptídicos descritos na literatura atuam de maneira covalente e irreversível (ANG, et al., 2011). No entanto, inibidores não peptídicos com ligação reversível, tempo-independente e competitiva são mais interessantes devido à possível melhora na biodisponibilidade, fatores sintéticos e seletividade (RISHTON, 2003; BRAK; et al., 2008). Nesse contexto, o MB15 (Figura 4) tem se mostrado um inibidor promissor. Ele apresenta atividade potente frente à enzima cruzaina, com um valor de concentração inibitória média de 5 μM determinado em ensaio fluorimétrico. Além disso, o MB15 demonstrou atividade *in vitro* contra diferentes espécies de *Trypanosoma*, conforme dados de CI_{50} depositados no banco de dados do PubChem: *T. cruzi*, 32 μM ; *T. brucei brucei*, 32 μM e *T. brucei rhodesiense* 16,1 μM (KAISER, et al., 2015; PEREIRA, et al., 2019). Esses resultados encorajam a continuidade dos estudos sobre o MB15 como um potencial candidato a fármaco no tratamento da DC.

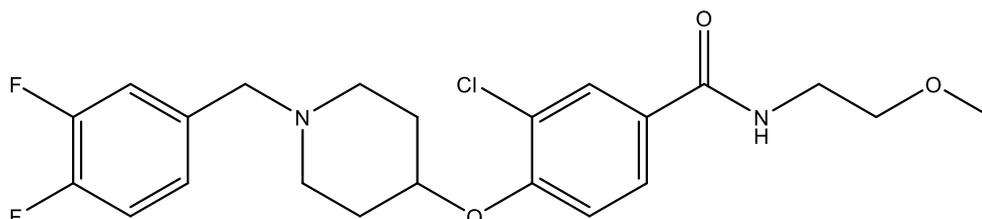


Figura 4: Estrutura do MB15 (3-cloro-4-((1-(3,4-difluorobenzil)piperidin-4-il)oxi)-N-(2-metoxietil)benzamida) Fonte: Autora.

Além disso, o MB15 apresenta uma vantagem em relação a outros compostos previamente estudados, pois possui diversos pontos suscetíveis a modificações (PEREIRA et al., 2019). Esses pontos permitem uma grande variabilidade estrutural a fim de explorar as interações cruciais entre a enzima e o ligante, visando otimizar a atividade e melhorar as propriedades farmacocinéticas. Portanto, o composto MB15 pode ser considerado um ponto de partida promissor na busca por novos inibidores de cruzaina com potencial tripanocida.

Sendo assim, um estudo utilizando docking molecular reproduziu uma biblioteca virtual de moléculas análogas ao MB15 definindo os materiais de partida necessários para a síntese dos análogos (SOUSA, 2021). Esses materiais foram selecionados com base nos reagentes disponíveis no Laboratório de Química Medicinal e Bioensaios da Escola de Farmácia da UFOP. Dando continuidade a esse projeto, o presente trabalho propõe a síntese de intermediários-chave para a obtenção do MB15 e seus análogos a partir dos reagentes estabelecidos, analisando as melhores condições reacionais para que seja estabelecida uma rota de síntese de análogos do MB15.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo principal a síntese e caracterização de derivados do MB15, planejados a partir de sua análise retrossintética e variação dos substituintes nos reagentes de partida.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar a síntese dos intermediários 4-hidroxi-*N*-benzilpiperidinas e as fenolamidas;
- Realizar o acoplamento das fenolamidas com as 4-hidroxi-*N*-benzilpiperidinas;
- Realizar a caracterização química das substâncias obtidas por meio de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C .

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Síntese e caracterização das substâncias

Para a síntese das substâncias propostas utilizou-se reagentes de fontes comerciais, sem prévia purificação. Realizou-se o acompanhamento das reações por meio de cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando sílica gel 60 G (Merck®) sobre lâmina de vidro, tendo a camada de sílica uma espessura de 0,25 mm. Foram utilizados como reveladores gerais a luz ultravioleta, vapor de iodo e Molibdato Cérico de Amônio (CAM), que consiste em uma solução aquosa de molibdato de amônio com sulfato de cério e ácido sulfúrico. Para a revelação das aminas, optou-se pela utilização de ninhidrina em solução etanólica 10% com gotas de ácido acético glacial. A caracterização das estruturas se deu por análise dos espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , realizadas no Laboratório Multiusuário de Caracterização de Moléculas da UFOP, adquiridos em espectrômetro Bruker AC-400 MHz. Utilizou-se como padrão interno o tetrametilsilano (TMS) e como solventes clorofórmio deuterado (CDCl_3) e dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO}-d_6$). Os valores dos deslocamentos químicos (δ) foram descritos em ppm e os valores de constante de acoplamento (J), em Hz. As faixas de fusão das substâncias sintetizadas foram determinadas no Laboratório de Química Medicinal e Bioensaios da Universidade Federal de Ouro Preto.

3.2 Obtenção do 4-metoxibenzoato de metila

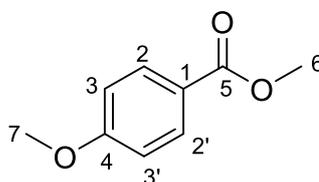


Tabela 1: Quantidades dos reagentes utilizados para obtenção do 4-metoxibenzoato de metila

Reagente	Massa molar	Nº equivalentes	Quantidade	Nº de mmols
Ácido 4-hidroxibenzoico	138,1g/mol	1	200 mg	1,44
Hidróxido de sódio	39,99g/mol	2	116 mg	2,89
Dimetilformamida	73,09 g/mol	-	3 mL	-
Iodometano	141,9g/mol	4	350 μ L ($d = 2,28$ g/mL)	5,76

Em um balão de fundo redondo de 25 mL, foram adicionados ácido 4-hidroxibenzoico e hidróxido de sódio em DMF, e a mistura foi agitada por aproximadamente 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado iodometano em um banho de gelo. O balão foi vedado com um septo de borracha e a reação mantida em agitação *overnight* em temperatura ambiente. O término da reação foi observado por meio de CCD, após eluição em hexano e acetato de etila (8:2) e revelado com vapor de iodo e CAM. Em seguida, realizou-se uma extração líquido-líquido utilizando acetato de etila como solvente e água destilada, obtendo-se o produto na fase orgânica. O solvente foi evaporado utilizando um rotavapor®, resultando em 104 mg de um sólido branco (44% de rendimento).

F.M.: C₉H₁₀O₃

M.M.: 166,18 g/mol

Faixa de fusão: 45°C

RMN de ¹H (δ ; CDCl₃; 400 MHz): 7,92 (d; 2H; H-2 e H-2' ³J = 8,6 Hz); 6,85 (d; 2H; H-3 e H-3', ³J = 8,6 Hz); 3,81 (s; 3H; H-6); 3,79 (s; 3H; H-7).

RMN de ¹³C (δ ; CDCl₃; 100 MHz): 166,9 (C-5), 163,3 (C-4), 131,5 (C-2 e C-2'), 122,5 (C-1), 113,5 (C-3 e C-3'), 55,4 (C-7), 51,8 (C-6).

3.3 Obtenção da N-benzilpropan-2-amina

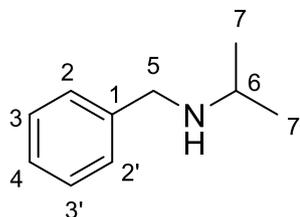


Tabela 2: Quantidades dos reagentes utilizados para obtenção da N-benzilpropan-2-amina

Reagente	Massa molar	Nº equivalentes	Quantidade	Nº de mmols
Benzaldeído	106,1g/mol	1	144 μ L ($d = 1,04$ g/mL)	1,41
Isopropilamina	59,11g/mol	5	600 μ L ($d = 0,69$ g/mL)	7,07
Diclorometano	84,93 g/mol	-	10 mL	-
Sulfato de sódio anidro	142g/mol	10	2000 mg	14,1
Borohidreto de sódio	37,83 g/mol	3	160 mg	4,23
THF/Metanol			3 mL/2 mL	

Em um balão de fundo redondo de 25 mL foram adicionados 144 μ L de benzaldeído, 600 μ L de isopropilamina em 10 mL de diclorometano e 2 g de sulfato de sódio. A reação foi mantida *overnight* a temperatura ambiente e com agitação magnética, quando se observou o consumo do material de partida por meio de CCD, utilizando como eluente hexano e acetato de etila (8:2).

Em seguida, realizou-se uma filtração em funil simples e papel de filtro, lavando o sulfato de sódio retido com diclorometano. O solvente foi recolhido em um balão de fundo redondo, removido em rotavapor®, e o material obtido utilizado imediatamente na etapa subsequente da reação. A esse balão, adicionou-se uma mistura de 3 mL de THF e 2 mL de metanol, seguida de 160 mg de borohidreto de sódio sob banho de gelo. A mistura foi mantida em agitação

magnética por 3 horas a temperatura ambiente. A evolução da reação foi acompanhada por CCD e, após o consumo do material de partida, deu-se início a elaboração consistindo na adição de uma solução de hidróxido de sódio 10% até atingir pH 12 e evaporação parcial dos solventes.

Em seguida, foi realizada uma extração líquido-líquido com acetato de etila, lavando-se com água destilada. A fase orgânica recolhida foi lavada com água acidificada com HCl 1 M até pH 3. Na sequência a fase aquosa acidificada foi coletada e alcalinizada até pH 8 utilizando uma solução de hidróxido de sódio 10%, sendo extraída novamente com acetato de etila. Essa fase orgânica final foi coletada, seca com sulfato de sódio e evaporada, resultando em 26 mg do produto como um óleo (12,5% de rendimento).

F.M.: C₁₀H₁₅N

M.M.: 149,24 g/mol

RMN de ¹H (δ; CDCl₃; 400 MHz): 7,40-7,28 (m; 5H; H-2, H-2', H-3, H-3' e H-4); 3,82 (s; 2H; H-5); 2,90 (h; 1H; H-6, ³J = 6,6 Hz); 1,15 (d; 6H; H-7 e H-7', ³J = 6,6 Hz).

RMN de ¹³C (δ; CDCl₃; 100 MHz): 139,4 (C-1), 128,5 (C-2, C-2' ou C-3, C-3'), 128,4 (C-2, C-2' ou C-3, C-3'), 127,2 (C-4), 51,1 (C-5), 48,2 (C-6), 22,6 (C-7 e C-7').

3.4 Obtenção da 4-benzilmorfolina

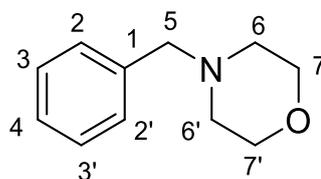


Tabela 3: Quantidades dos reagentes utilizados para obtenção da 4-benzilmorfolina

Reagentes	Massa molar	Nº equivalente	Quantidade	Nº de mmol
Benzaldeído	106,1g/mol	1	288 μ L ($d = 1,04$ g/mL)	2,82
Morfolina	87,1g/mol	5	1,2 mL	14,1
Diclorometano	84,93 g/mol	-	10 mL	-
Peneira molecular	-	-	3 g	-
Borohidreto de sódio	37,83 g/mol	3	320 mg	8,46
THF/Metanol	-	-	3 mL/2 mL	-

Em um balão de fundo redondo de 25 mL, foram adicionados 288 μ L de benzaldeído, 1,2 mL de morfolina e 10 mL de diclorometano contendo aproximadamente 3 g de peneira molecular de 3 Å. A reação foi mantida durante a noite sob agitação magnética e a temperatura ambiente. O término da reação foi confirmado por CCD, utilizando uma cuba com eluição de hexano/acetato de etila (8:2). A fase orgânica foi coletada e seca com sulfato de sódio, realizando-se uma filtração utilizando um funil simples e papel de filtro. O filtro foi lavado com diclorometano para garantir a extração do produto retido no sulfato de sódio. O solvente foi então evaporado utilizando um rotavapor®, e o produto obtido foi utilizado na etapa seguinte da reação.

No mesmo balão de reação adicionou-se 5 mL de uma mistura 1:1 dos solventes THF e metanol e 320 mg de borohidreto de sódio sob banho de gelo. A mistura foi mantida em agitação por aproximadamente 3 horas, acompanhando-se o progresso da reação por CCD. Ao final da reação, adicionou-se uma solução de hidróxido de sódio 10% até atingir pH 12 e os solventes THF e metanol foram parcialmente removidos em rotavapor®.

Em seguida, realizou-se uma extração líquido-líquido utilizando acetato de etila, lavando com água destilada, seguida de água acidificada até pH 3 utilizando uma solução de HCl 1 M. A fase aquosa foi coletada, alcalinizada até pH 8 utilizando a solução de hidróxido de sódio e extraída novamente com acetato de etila. A fase orgânica foi coletada, seca com sulfato de sódio

anidro e evaporada. O produto bruto obtido passou por uma purificação por cromatografia em coluna de sílica (CCS), utilizando uma mistura de hexano e acetato de etila (9:1) como fase móvel. Obteve-se 84 mg do produto puro na forma de um óleo (44% de rendimento).

F.M.: C₁₁H₁₅NO

M.M.: 177,25 g/mol

RMN de ¹H (δ; CDCl₃; 400 MHz): 7,35-7,27 (m; 5H; H-2, H-2', H-3, H-3' e H-4); 3,75 (ta; 4H; H-7 e H-7', ³J = 4,0 Hz); 3,55 (s; 2H; H-5); 2,50 (sl; 4H; H-6 e H-6').

RMN de ¹³C (δ; CDCl₃; 100 MHz): 137,0 (C-1); 129,3 (C-2, C-2' ou C-3, C-3'), 128,3 (C-2, C-2' ou C-3, C-3'), 127,3 (C-4); 66,7 (C-7 e C-7'); 63,5 (C-5); 53,4 (C-6 e C-6').

3.5 Obtenção e dados de caracterização da 1-[(3,4-difluorofenil) metil]piperidin-4-ol

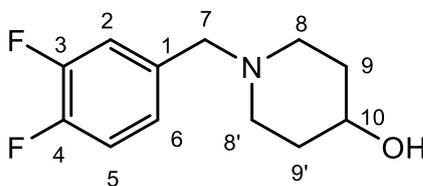


Tabela 4: Quantidades dos reagentes utilizados para obtenção da 1-(3,4-difluorbenzil)piperidin-4-ol

Reagente	Massa molar	Nº equivalentes	Quantidade	Nº de mmols
3,4-Difluorbenzaldeído	142,1g/mol	1	72 µL (<i>d</i> = 0,71,18)	0,7
4-Hidroxipiperidina	102,2g/mol	1,5	107 mg	1,05
Sulfato de sódio anidro	142g/mol	10	2000 mg	14,1
Cianoborohidreto de sódio	62,84 g/mol	3	131 mg	2,1
THF/Metanol	-	-	5 mL/5 mL	-

Em um balão de 25 mL foram adicionados 72 μL de 3,4-difluorbenzaldeído, 107 mg de 4-hidroxipiperidina, 5 mL de THF, 5 mL de metanol, 10 gotas de CH_3COOH e uma ponta de espátula de Na_2SO_4 (~ 2 g). A reação foi iniciada a temperatura ambiente com agitação magnética e, após aproximadamente 3 horas de agitação, observou-se a formação de um produto por meio de CCD, utilizando uma cuba com o eluente hexano e acetato de etila (8:2). O conteúdo do balão foi transferido para outro balão de fundo redondo por meio de uma filtração em funil simples e algodão.

O filtro foi lavado com THF para garantir a extração do produto retido em sulfato de sódio. Na segunda etapa da reação, adicionou-se, sob banho de gelo, 131 mg de NaBH_3CN ao balão contendo o filtrado. A mistura foi mantida em agitação magnética durante a noite a temperatura ambiente. Em seguida, o solvente foi evaporado utilizando um rotavapor®. Fez-se então uma extração líquido-líquido utilizando acetato de etila e água alcalinizada até pH 10 com 5 mL de uma solução de NaHCO_3 8%. A fase orgânica foi recolhida, seca com sulfato de sódio anidro e evaporada, resultando no produto bruto. Este foi parcialmente purificado por CCS, utilizando uma mistura de hexano e acetato de etila (7:3 \rightarrow 1:1). Obteve-se 123 mg do produto ainda impuro na forma de um semissólido oleoso, representando 76,8% do rendimento teórico.

F.M.: $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{F}_2\text{NO}$

M.M.: 227,25 g/mol

RMN de ^1H (δ ; CDCl_3 ; 400 MHz): presença de impurezas não permitiu a atribuição dos sinais.

RMN de ^{13}C (δ ; CDCl_3 ; 100 MHz): 151,6 (C-3); 149,1 (C-4); 131,5 (C-1); 126,4 (C-6); 119,2 (C-2); 117,4 (C-5); 65,7 (C-10); 60,6 (C-7); 49,4 (C-8 e C-8'); 32,4 (C-9 e C-9').

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise retrossintética do MB15

A partir da análise retrossintética do MB15 (Figura 5), foram propostos substituintes para os materiais de partida representados na figura a abaixo, **A**: aminas; **B**: derivados do ácido *p*-hidroxibenzóico e **C**: aldeídos aromáticos, visando obter uma ampla variedade estrutural. Com base em informações previamente conhecidas sobre inibidores da cruzaína em geral, podem ser aplicadas modificações moleculares clássicas, como variação do substituinte, variação na posição do substituinte e expansão da cadeia alquila, a fim de obter uma variação estrutural suficiente para se estabelecer uma relação estrutura-atividade para esse padrão estrutural. A seleção das moléculas foi realizada em trabalho prévio do grupo de pesquisa por meio de uma triagem virtual, via docking molecular, utilizando a estrutura tridimensional da cruzaína como alvo (SOUSA,2021).

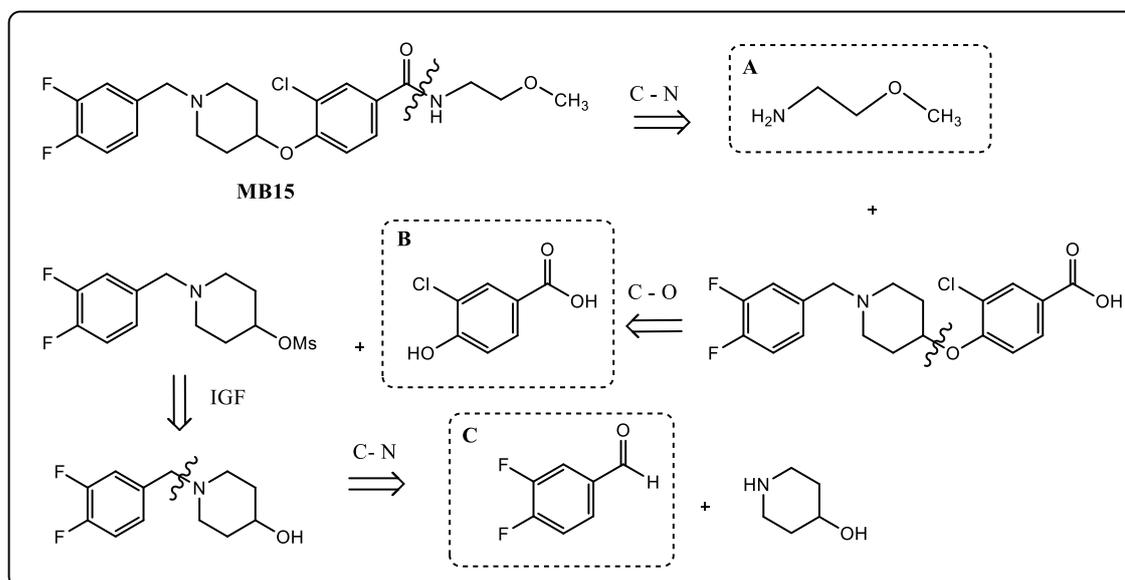


Figura 5: Análise retrossintética do MB15. Fonte: Autora.

A partir da seleção dos reagentes de partida, decidiu-se, portanto, planejar a síntese dos compostos de maneira convergente, a partir de intermediários-chave que compõem a estrutura do MB15. Esses intermediários seriam as benzilpiperidinas, que consistem em um heterociclo de seis membros contendo nitrogênio, substituído na posição 4 por um álcool e ligado a um grupo benzila pelo nitrogênio, e as hidroxibenzilamidas que são caracterizadas por uma amida formada a partir de ácidos 4-hidroxibenzóicos (Figura 6). Esses intermediários oferecem

diversas possibilidades de modificações e, com uma rota convergente buscava-se aumentar a eficiência da obtenção de análogos pela combinação de estruturas contendo substituintes diferentes, assim como a redução dos custos.

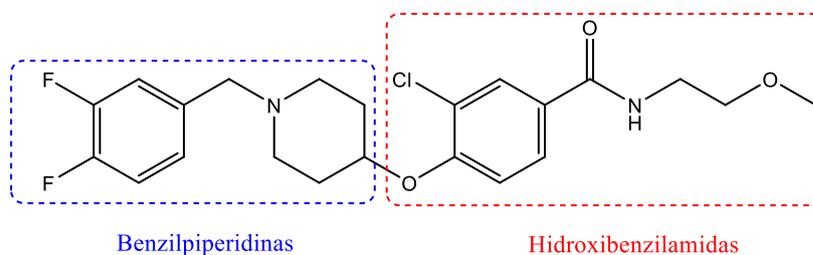


Figura 6 : Estrutura do MB15 evidenciando os intermediários propostos. Fonte: Autora.

A rota de síntese planejada então partiria do ácido 4-hidroxibenzóico ou derivados que seria utilizado na obtenção da amida a partir da reação com aminas selecionadas pela modelagem molecular em um trabalho paralelo (Figura 7) (SOUSA, 2021).

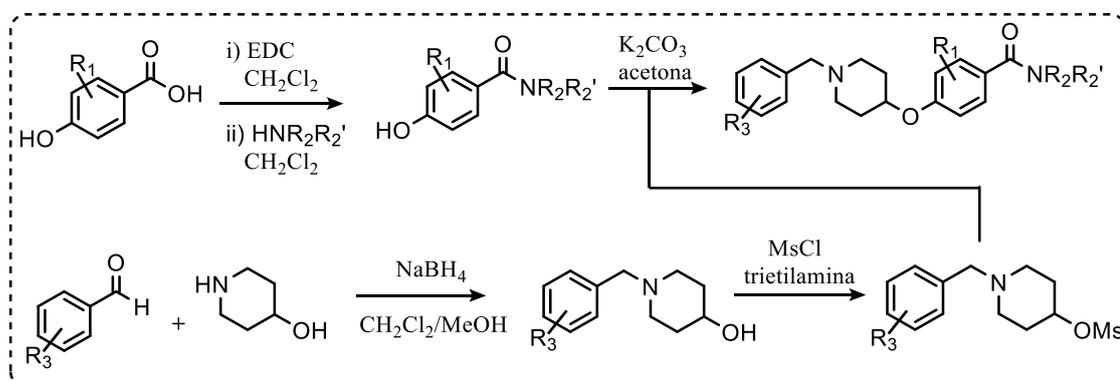


Figura 7: Rota de síntese para obtenção das substâncias propostas. Fonte: Autora.

Essa reação ocorreria, utilizando um ácido carboxílico aromático em conjunto com o cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) usado como agente de ativação, a fim de catalisar a reação de acoplamento entre o grupo carboxila e uma amina primária ou secundária, formando assim as fenolamidas.

Paralelamente, seriam conduzidas aminações redutivas empregando aldeídos aromáticos e aminas, utilizando uma mistura de diclorometano/metanol e usando agente redutor a base de boro, resultando, assim, na síntese da 4-hidroxibenzilpiperidina. A transformação subsequente do álcool da 4-hidroxibenzilpiperidina em um mesilato, com reação com cloreto de

metanossulfonila e trietilamina. Essa reação proporciona a substituição seletiva do grupo hidroxila da 4-hidroxibenzilpiperidina pelo grupo metanossulfonila, fornecendo um bom grupo de saída, propício para reações subsequentes.

Finalmente, o acoplamento das fenolamidas com o mesilato, resultante da etapa anterior, seria realizado em acetona na presença de carbonato de potássio para desprotonar a hidroxila fenólica da fenolamida, criando um íon nucleofílico suficiente para atacar o carbono eletrofílico do mesilato, resultando em análogos ao MB15.

4.2 Obtenção de hidroxibenzilamidas intermediárias

Inicialmente, o ácido 4-hidroxibenzoico foi escolhido como o material de partida principal para a formação das hidroxibenzilamidas. Essa escolha se deve ao fato de sua estrutura possuir uma hidroxila em posição *para* à função ácido carboxílico no anel benzoico, assim como no MB15, no entanto, sem qualquer outro substituinte. Esse reagente de partida mais simples e acessível foi utilizado para estabelecer as condições de reação para a obtenção das hidroxibenzilamidas.

Através de métodos que envolvem reações de adição nucleofílica de amônia ou uma amina a um carbono carbonílico, é possível obter amidas. Porém, os ácidos carboxílicos reagem com amônia em solução aquosa, formando sais de amônio e o íon carboxilato, cuja baixa reatividade impede uma reação de adição nucleofílica. No entanto, se evaporarmos a água e, em seguida, aquecermos o par iônico, ocorrerá a desidratação e a formação de uma amida (SOLOMONS, 2006). A necessidade de remoção de água e temperaturas acima de 420°C podem comprometer a integridade dos reagentes, constituindo um desafio significativo na síntese dessas moléculas.

Portanto, é frequentemente necessário ativar previamente o ácido carboxílico, convertendo o grupo hidroxila (-OH) do ácido em um bom grupo abandonador mais adequado antes de prosseguir com a reação com a amina (VALEUR e BRADLEY, 2009). Uma estratégia comumente empregada para ativar os ácidos carboxílicos é a utilização de agentes de acoplamento (Figura 8).

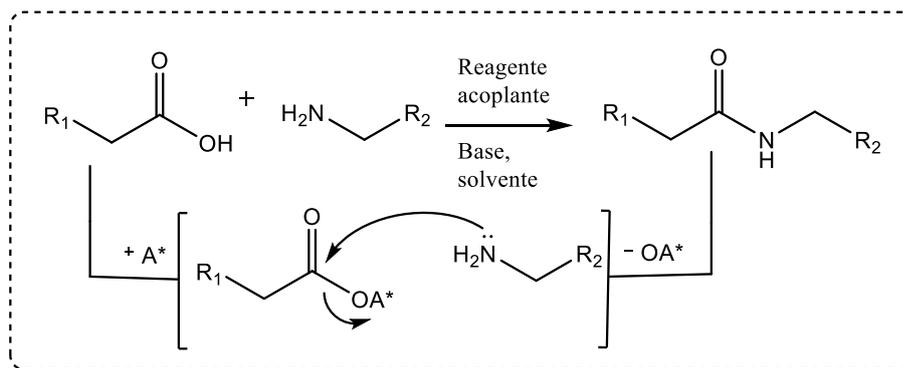


Figura 8: Método convencional de formação de amidas. Envolve a ativação do ácido carboxílico por um grupo ativante (A^*), seguido de um ataque nucleofílico da amina gerando uma ligação amida na presença de um reagente de acoplamento, base e solvente. Fonte: Adaptado PATTABIRAMAN et al., 2011.

Esses agentes desempenham o papel de gerar compostos mais reativos, tais como cloretos de ácido, anidridos (mistos) ou ésteres ativados. Diversas revisões publicadas acerca dos agentes de acoplamento oferecem uma análise crítica aprofundada desse tema. Nesse contexto, a importância desse processo é incontestável, uma vez que a eficácia da ativação dos ácidos carboxílicos está diretamente vinculada à avaliação cuidadosa da natureza desses ácidos, da reatividade dos agentes de acoplamento, das condições experimentais e dos requisitos específicos da reação. A seleção do agente de acoplamento mais apropriado é um passo crucial, visando maximizar os rendimentos e a seletividade desejados no resultado final da reação (VALEUR e BRADLEY, 2009).

A importância dessa reação se torna evidente pois a acilação de aminas com ácidos carboxílicos ativados é a reação mais amplamente utilizada na síntese de produtos farmacêuticos modernos, representando aproximadamente 16% de todas as reações, conforme evidenciado por uma análise de dados em química medicinal (PATTABIRAMAN e BODE, 2011). Dessa forma, adotou-se um método clássico de conversão de ácidos carboxílicos em amidas, por meio da utilização de haletos de acila como intermediários. O processo consiste, primeiramente, na conversão do ácido em seu respectivo haleto de acila, seguida pela reação desse haleto com uma amina (Figura 9) (MONTALBETTI e FALQUE, 2005).

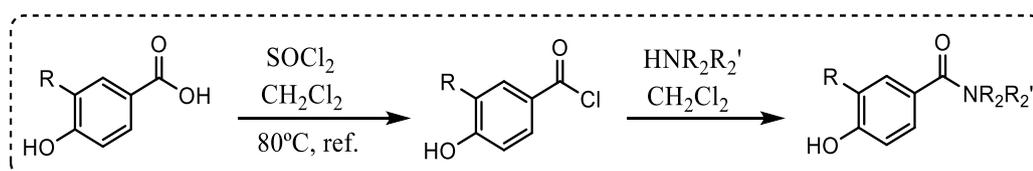


Figura 9: Obtenção das amidas pela formação de um cloreto de ácido. Fonte: Autora.

A formação do intermediário tem como objetivo transformar o material de partida em uma espécie mais reativa. Isso porque existe uma ordem geral de reatividade de compostos carbonílicos que se pode estabelecer a partir do grupo ligado a carbonila. Em geral, quando existem grupos doadores de elétrons ligados a carbonila, como é o caso da hidroxila, a eletrofilicidade diminui, tal qual a reatividade frente a nucleófilos. Isso é especialmente verdadeiro quando o par de elétrons de tal grupo é capaz de realizar ressonância mais efetivamente com a carbonila, como no caso do íon carboxilato ou da própria amida. Sendo assim, os cloretos de ácido são mais reativos porque o efeito retirador de elétrons do átomo de cloro aumenta a eletrofilicidade do carbono carbonila (CLAYDEN et al., 2012).

Os reagentes cloreto de tionila (SOCl_2), cloreto de oxalila ($(\text{COCl})_2$), tricloreto de fósforo (PCl_3), oxicloreto de fósforo (POCl_3) e o pentacloreto de fósforo (PCl_5) são comumente usados para gerar cloretos de acila a partir de seus respectivos ácidos com um custo relativamente baixo. No entanto, uma das principais desvantagens dos agentes clorantes previamente citados é a produção de HCl no meio reacional, podendo levar a reações não desejadas com outros grupos funcionais da molécula. Sendo assim, a presença de uma base orgânica normalmente é necessária para neutralizar o HCl formado ao longo da reação (MONTALBETTI e FALQUE, 2005).

Assim, para a formação do cloreto de ácido correspondente do ácido 4-hidroxibenzóico, inicialmente optou-se pela reação com o cloreto de tionila. (HYATT et al. 2007). O mecanismo dessa reação é mostrado na Figura 10A. Primeiramente, o cloreto de tionila, contendo um átomo de enxofre, forma um complexo de ativação com o ácido carboxílico, resultando em uma espécie altamente eletrofílica e instável. A formação desse intermediário reativo possibilita que o íon cloreto (Cl^-) resultante atue como nucleófilo, levando à formação de um intermediário tetraédrico. Posteriormente, ocorre a eliminação de dióxido de enxofre (SO_2) e ácido clorídrico (HCl) do intermediário tetraédrico, resultando na formação do cloreto de acila desejado. É importante ressaltar que essa etapa é irreversível, uma vez que tanto o dióxido de enxofre quanto o ácido clorídrico são gases e são perdidos durante a reação (CLAYDEN et al., 2012).

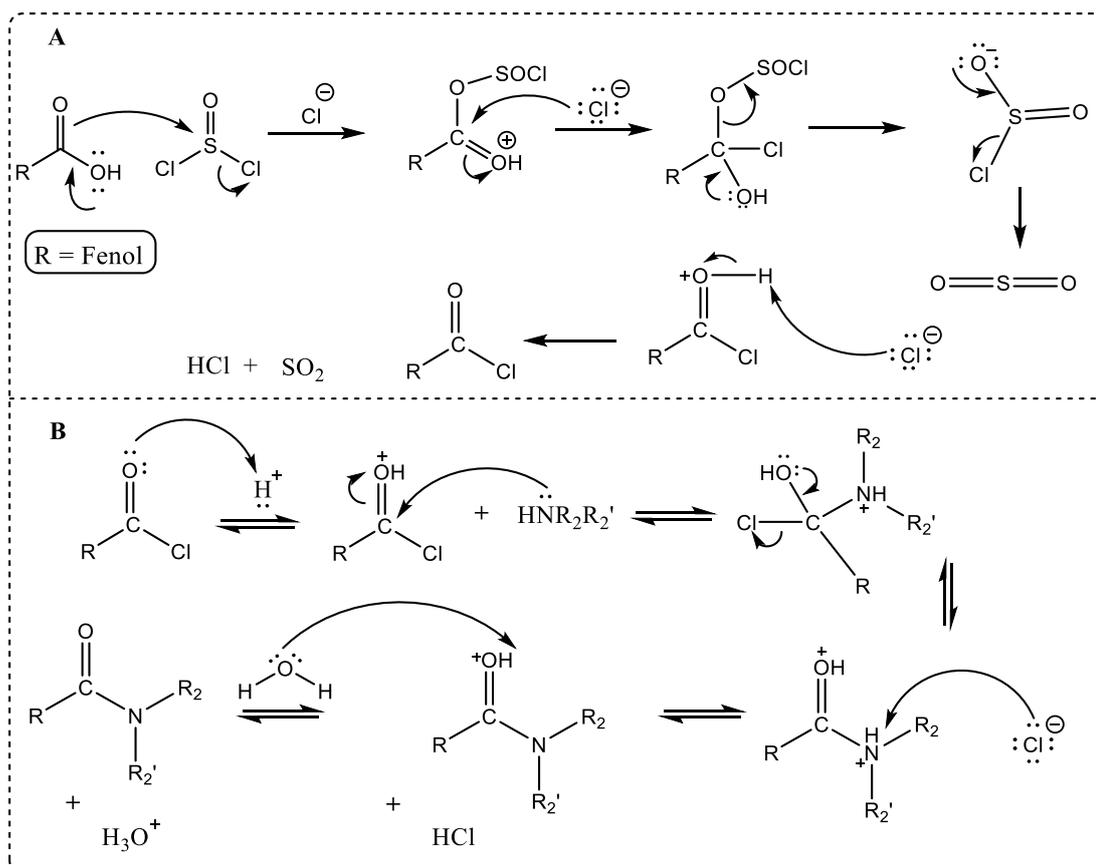


Figura 10: Proposta de mecanismo A para reação de acilação/formação do cloreto de ácido e B para reação de formação da amida. Fonte: Autora.

A segunda etapa da reação consiste na adição de uma amina ao cloreto de ácido formado anteriormente. O mecanismo se repete, mas o carbono é atacado dessa vez pelo par de elétrons livres presentes no nitrogênio da amina adicionada e, em seguida, ocorre a eliminação do átomo de cloro, regenerando a dupla ligação carbono-oxigênio da carbonila. Adicionalmente a reação pode ser realizada em meio ácido, nesse caso, ocorre a protonação do oxigênio carbonílico, favorecendo o ataque ao carbono eletrofílico (Figura 10B).

No, entanto as tentativas de síntese desse composto não obtiveram bons resultados, pois, em diversas tentativas, o produto desejado puro e com rendimento adequado não foi obtido. Conforme análise por CCD, foi observado que o R_f do produto era igual ao do material de partida, indicando que o ácido de partida não estava sendo consumido. Com base nessa análise, levantam-se as hipóteses que o cloreto pode não ter sido formado ou que tenha sofrido hidrólise de volta ao ácido no decorrer da reação. Essa ocorrência provavelmente é atribuída às restrições na etapa de síntese do cloreto de acila, que demonstra uma notável sensibilidade à presença de umidade. Adicionalmente, o cloreto de tionila foi utilizado sem prévia purificação e, se tratando

de um reagente igualmente sensível a umidade devido a sua alta reatividade, poderia estar com produtos de degradação, impossibilitando a reação.

Durante a síntese supõe-se que a hidrólise de uma amida possivelmente formada em meio reacional seja uma hipótese pouco provável. Isso se deve ao fato de que as condições reacionais necessárias para hidrólise de amidas normalmente requerem um ácido ou base concentrada e altas temperaturas, aproximadamente 200°C (CLAYDEN et al., 2012). Durante algumas reações, foi notada a ocorrência de um precipitado branco no balão reacional, indicando a formação de um sal resultante da reação ácido-base entre o ácido carboxílico que não se transformou em cloreto e a amina presente.

A partir dos insucessos mencionados, utilizou-se uma segunda técnica para obter o cloreto ácido a partir do ácido *p*-hidroxibenzoico. Nessa abordagem, a reação foi conduzida com cloreto de tionila à temperatura ambiente, porém adicionando gotas de DMF como catalisador (MONTALBETTI e FALQUE, 2005).

A DMF é empregada como catalisador no processo de clordesidroxilação, como na síntese de halogenetos de acila a partir dos ácidos carboxílicos correspondentes utilizando cloreto de tionila. Nas etapas iniciais, o cloreto de tionila reage com a DMF, gerando um intermediário altamente eletrofílico e liberando dióxido de enxofre e HCl como subprodutos (Figura 11). Esse intermediário, por sua vez, reage prontamente com um ácido carboxílico, formando um éster intermediário e HCl. Na etapa subsequente, ocorre a adição do cloreto ao carbono carbonílico, resultando na formação de um cloreto de acila e regenerando a DMF (LOUVIS et al., 2016).

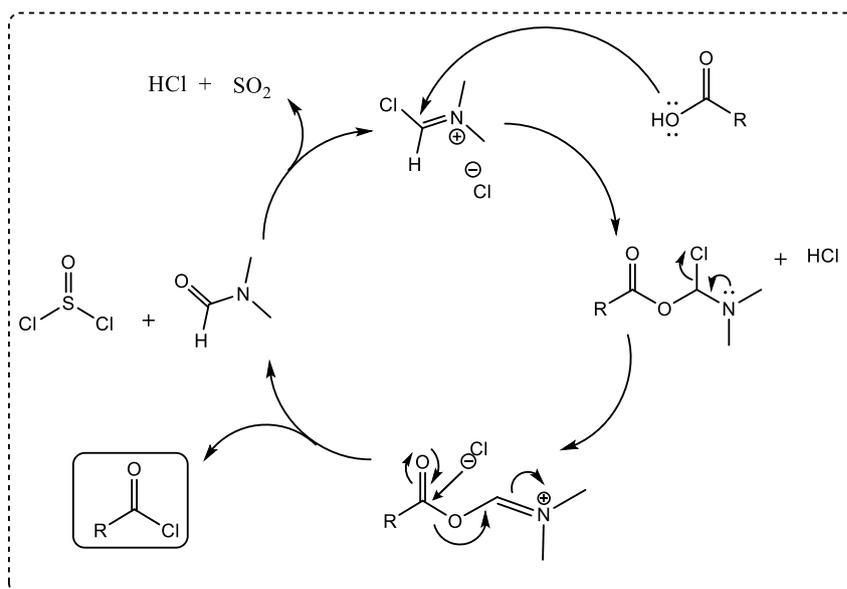


Figura 11: Ativação com DMF: ciclo catalítico Fonte: Adaptado de MONTALBETTI et al., 2005.

O produto da reação por essa técnica foi utilizado na etapa de obtenção da amida, sem purificação prévia com receio da instabilidade do cloreto de ácido. No entanto, ainda que as análises por CCD revelassem uma mancha compatível com formação da amida, a quantidade obtida inicialmente foi muito pequena (33 mg). Tentativas subsequentes de se acumular produto foram realizadas, mas em todas elas a instabilidade da molécula, observada pela formação de produtos de degradação em CCD, inviabilizou sua completa caracterização e utilização.

Com base nesses resultados e considerando que a hidroxila fenólica livre poderia estar relacionada com o insucesso das reações, sobretudo se na forma de fenolato, um bom nucleófilo, optou-se por introduzir um grupo protetor nessa posição. Inicialmente escolheu-se introduzir o grupo protetor na forma de um éster, pois este seria de fácil remoção posteriormente, uma vez que o éster seria susceptível a hidrólise em condições mais brandas do que a amida, como explicado anteriormente.

Para isso, utilizou-se uma reação de acetilação com o ácido *p*-hidroxibenzóico, empregando o anidrido acético e gotas de ácido sulfúrico como catalisador (Figura 12). Seguindo essa proposta, o processo de acilação foi conduzido, em que o ácido sulfúrico atuou como catalisador, ativando a carbonila do anidrido. A hidroxila fenólica atua como nucleófilo, resultando na transferência do grupo acetila para a hidroxila e formando o éster.

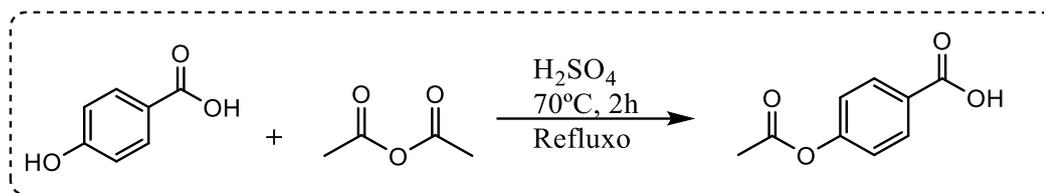


Figura 12: Proteção da hidroxila fenólica pela formação de um éster. Fonte: Autora.

Essa proteção da hidroxila fenólica é de relevância em síntese orgânica, proporcionando uma maior estabilidade ao grupo funcional e permitindo futuras etapas de desproteção (JIN, et al., 1998). Quando observado em CCD, o material de partida e o produto formado dão origem a manchas muito semelhantes e de Rf muito próximos, mesmo utilizando eluentes diferentes. Portanto, para identificar a formação do produto, realizou-se o ponto de fusão do ácido 4-hidroxibenzoico, que foi de ~200°C, estando dentro do esperado (HYATT et al. 2007), e comparou-se com o produto obtido, que foi de ~180°C, mais próximo ao descrito na literatura (191°C).

Contudo, após a utilização dessa técnica, não foi possível obter um espectro de RMN satisfatório, pois o produto degradava de volta ao ácido carboxílico de partida até o momento da análise, conforme observado por espectro e CCD posterior a análise de RMN de ¹H (Figura 13) e de ¹³C (Figura 14). Através do espectro de hidrogênio é possível analisar dois sistemas *para*-substituídos, um em 8,00-7,77 ppm provavelmente referente ao éster, já os sinais em 7,28-6,81 ppm poderiam ser atribuídos ao ácido de partida. No espectro de carbono, há múltiplos sinais de carbonos aromáticos, ou seja, mais do que os 4 esperados, e as carbonilas, por volta de 166,6 e 168,9 ppm, de maior intensidade provenientes do produto protegido, porém outro sinal de menor intensidade em 161,6 ppm, por exemplo, sugere contaminação com o ácido de partida. Por fim, apesar da mistura aparente de produtos uma confirmação da proteção da hidroxila fenólica se dá, também, pela presença do sinal em 20,9 ppm correspondente ao carbono alfa carbonila do éster desejado.

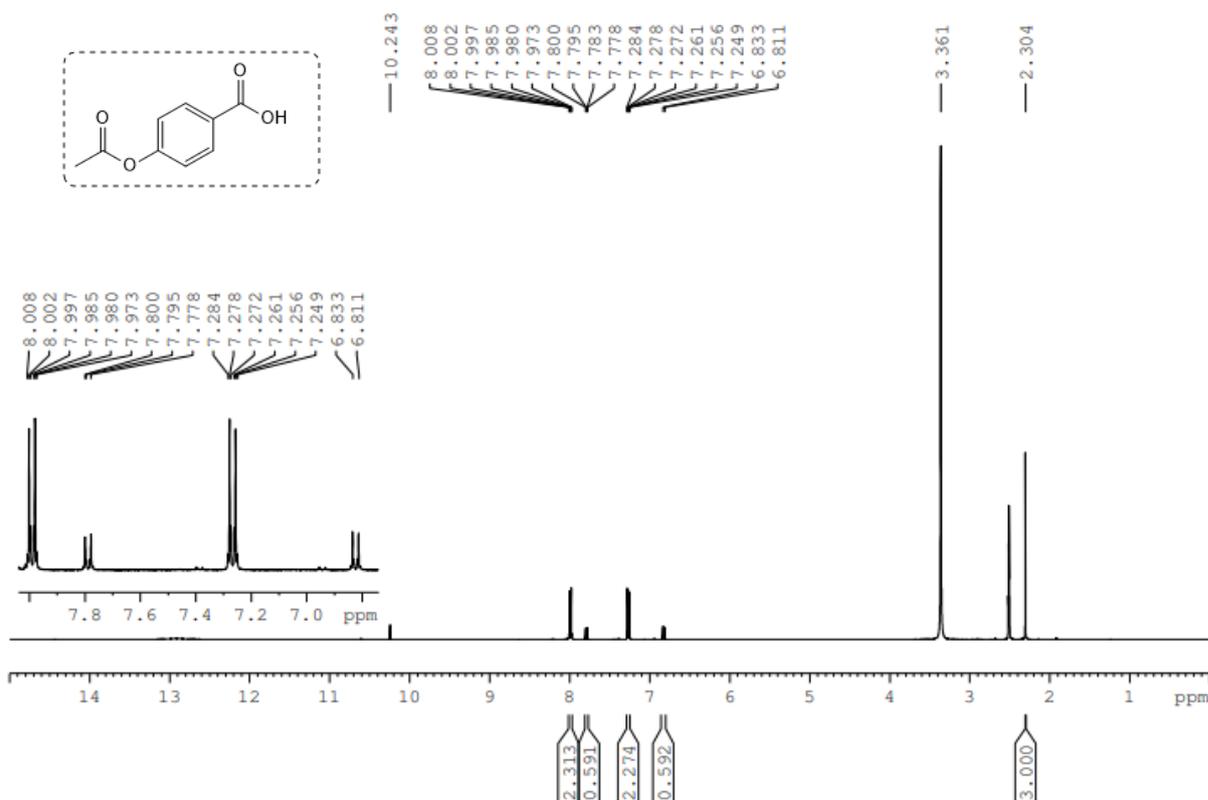


Figura 13: Espectro de RMN de ¹H do produto obtido na reação de proteção da hidroxila fenólica. Fonte: Autora.

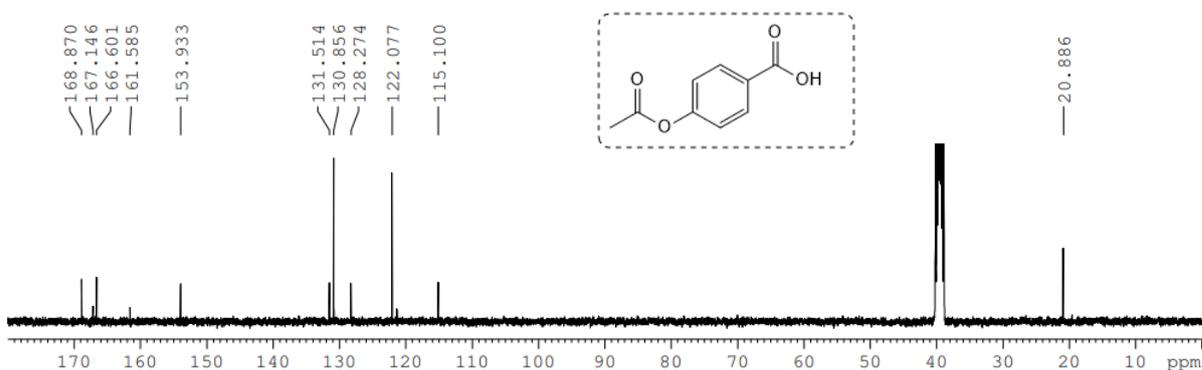


Figura 14: Espectro de RMN de ¹³C do produto obtido na reação de proteção da hidroxila fenólica. Fonte: Autora.

Diante da dificuldade de se obter o cloreto de ácido desejado e da proteger a hidroxila fenólica com a formação de um éster, uma nova alternativa foi explorada para a proteção da hidroxila fenólica (Figura 15). Essa estratégia envolveu a conversão simultânea do grupo carboxila e do grupo hidroxila fenólica em um éster e um éter metílico, respectivamente, por meio de uma reação com excesso de iodometano, utilizando hidróxido de sódio para desprotonar a hidroxila e o ácido carboxílico (SATO e ENDO, 2009).

Dessa forma, o grupo carboxila seria transformado em um éster, grupo mais reativo para reação com a amina, enquanto a hidroxila fenólica seria protegida na forma de um éter. Depois da formação da amida, ocorreria a conversão do éter metílico de volta ao fenol, utilizando um reagente amplamente empregado, o AlCl_3 , com o propósito de regenerar o grupo hidroxila. O AlCl_3 é um ácido de Lewis capaz de coordenar o par solitário do oxigênio do éter. Assim, os pares eletrônicos do átomo de oxigênio coordenam ao íon central de alumínio, e o grupo cloro se desprende, resultando em reação com o grupo metil, o qual possui uma carga positiva parcial. Isso leva à formação de clorometano como subproduto, assim como um complexo R-O-AlCl_2 . Este último complexo pode ser decomposto por meio do uso de NaHCO_3 (OLIVEIRA, et al., 2019)

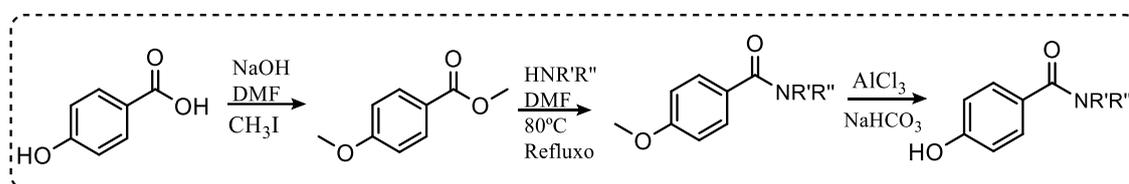
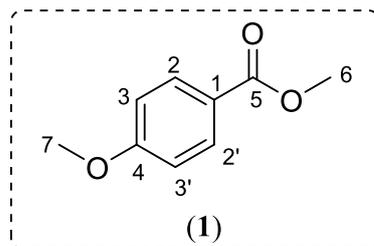


Figura 15: Estratégia alternativa para a formação de amida a partir do ácido p-hidroxibenzóico, envolvendo a proteção e regeneração da hidroxila fenólica. Fonte: Autora.

Após a formação dos íons carboxilato e fenolato pela adição de hidróxido de sódio, tornando-os mais nucleofílicos, o iodometano foi adicionado. Esse consiste em um eletrófilo eficiente devido à característica do íon iodeto de se comportar como bom grupo abandonador. Adicionalmente, essas reações foram realizadas em presença de DMF anidro como solvente, o que facilita reações de substituição nucleofílica do tipo $\text{S}_{\text{N}}2$. Essa preferência ocorre devido à característica do DMF de ter um centro carbonílico eletronicamente deficiente, porém impedido estericamente para interação com ânions. Isso se deve à proximidade as duas metilas adjacentes ao carbono carbonílico. Por outro lado, o oxigênio da molécula, que possui maior densidade eletrônica, está mais exposto e pode interagir livremente com cátions, que são os contra-íons do nucleófilo aniônico. Essa propriedade facilita o ataque nucleofílico dos ânions aos substratos nas reações de $\text{S}_{\text{N}}2$ (LOUVIS et al., 2016). O composto formado foi caracterizado por RMN e imediatamente utilizado, na formação das amidas, uma vez que o grupo éster é mais reativo que o ácido carboxílico, o que em tese eliminaria a necessidade do preparo do cloreto de ácido.



No espectro de RMN de ^1H do éter metílico, os sinais correspondentes aos hidrogênios aromáticos foram registrados com dois dupletos de integral para 2 hidrogênios cada em 7,92 e 6,85 ppm e 3J de 8,6 Hz, compatível com um sistema aromático *para*-substituído. Os sinais dos hidrogênios *orto* a metoxila foram atribuídos ao sinal mais blindado (6,85 ppm) devido ao efeito indutivo exercido pelo oxigênio presente, além de estarem *meta* a uma carbonila que doa por ressonância. Os hidrogênios das metilas do éster e o éter, foram registrados como simpletos de integral igual a 3 em 3,81 e 3,79 ppm, respectivamente, indicando que houve a formação do produto.

No que se refere aos espectros de RMN de ^{13}C , foram observados sinais referentes aos carbonos aromáticos na faixa de 162-113 ppm, sendo o carbono vizinho a carbonila em 122,5 ppm mais blindado, seguido do C-2 e C-2' em 131,5 ppm e C-3 e C-3' em 113,5 ppm, sinal mais blindado devido à conjunção do efeito doador de densidade eletrônica por ressonância do oxigênio na posição *orto* e ao efeito oposto da carbonila na posição *meta*. Por fim o carbono C-4 foi registrado em 163,3 ppm, por estar ligado diretamente ao átomo de oxigênio. Já os carbonos C-6 e C-7 pertencentes ao grupo metil foram encontrados em 51,8 e 55,4 ppm, mais uma vez confirmando que a reação foi bem-sucedida. Além disso, o sinal característico do carbono carbonílico deste derivado foi encontrado em 166,9 ppm, compatível com um éster aromático. Ambos os espectros estão apresentados no ANEXO 1-A.

Contudo, após a formação do éster ao reproduzir a reação com amina não se obteve o resultado esperado. Uma vez que a quantidade de produto obtida foi de aproximadamente 20mg e a CCD revelou uma sequência de manchas, entre elas uma retida na base, podendo ser a amina que não reagiu e também uma segunda com Rf similar ao ácido 4-hidroxibenzoico, simbolizando que o éster de partida estaria hidrolisado.

Diante desse contexto, foi realizado um teste para a formação da amida por meio da ativação do grupo ácido carboxílico, convertendo-o em um éster ativado utilizando o EDC e DMAP (4-

dimetilaminopiridina), tornando-o um eletrófilo mais reativo, facilitando o ataque nucleofílico da amina ao carbono eletrofílico da carbonila (NEISES e STEGLICH, 1978; MONTALBETTI e FALQUE, 2005).

A formação do éster ativado ocorre quando o DMAP captura o hidrogênio da hidroxila do ácido carboxílico, conseqüentemente a carbodiimida sofre um ataque nucleofílico do carboxilato formado anteriormente, resultando na formação do éster ativado. Em seguida, o nitrogênio aromático presente no DMAP atua como nucleófilo no carbono carbonílico formando o intermediário tetraédrico. Após a regeneração da carbonila pelo oxigênio de carga negativa, obtém-se o composto passível de sofrer uma adição nucleofílica ao adicionar uma amina ao meio reacional. Por fim, tem-se a formação da amida desejada, juntamente com a conversão do EDC em uma ureia (Figura 16) (CLAYDEN et al., 2012).

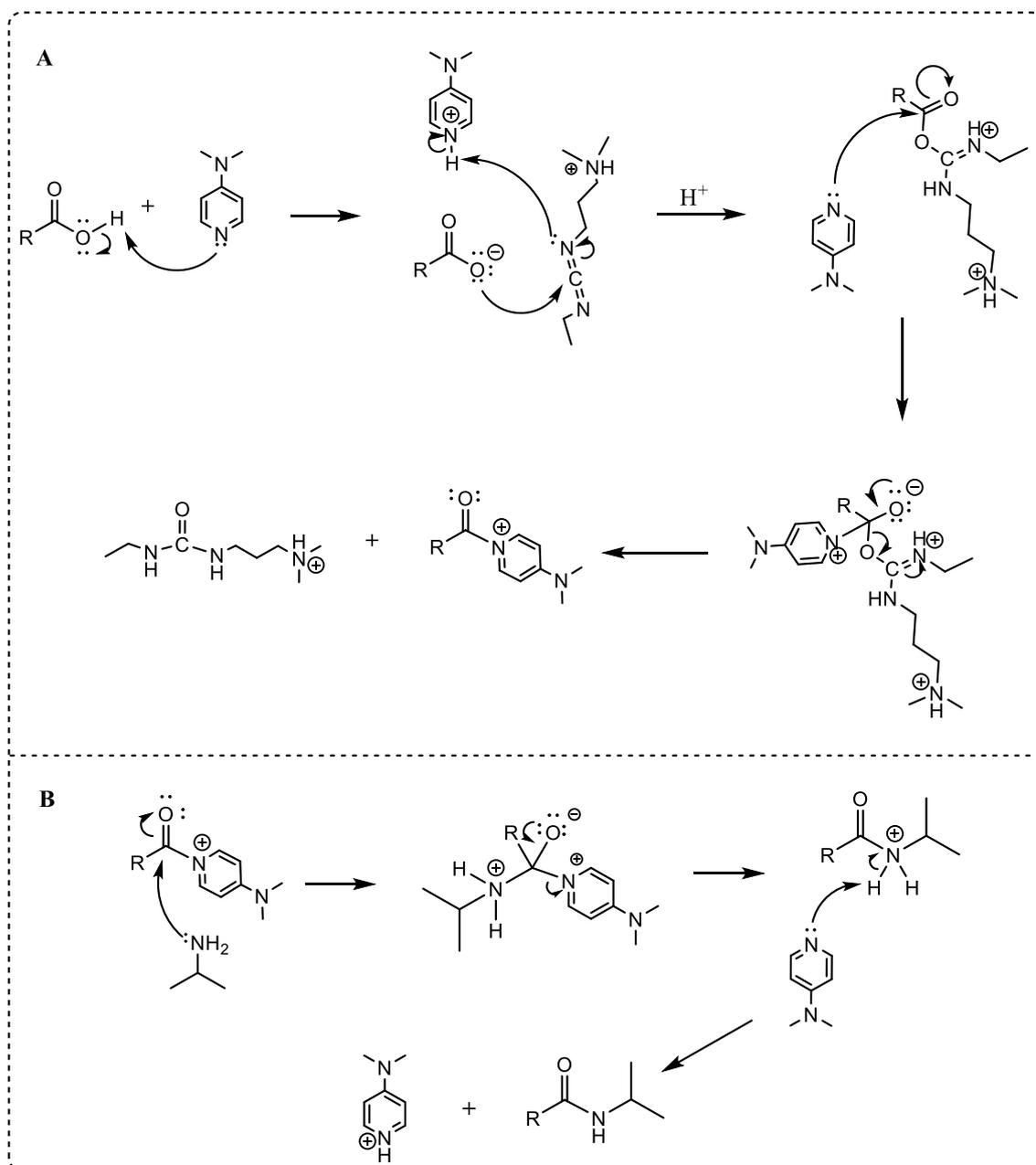


Figura 16: Proposta de mecanismo para formação do éster ativado (A) com subsequente formação da amida (B). Fonte: Autora.

Durante a reação observou-se por CCD a formação de um produto, mesmo que o material de partida não tivesse sido consumido totalmente. Também se observou a formação de muitos subprodutos. Sendo assim, foi necessária a purificação do produto bruto por meio de uma CCS utilizando como eluentes uma mistura de hexano e acetato de etila na proporção 8:2. O produto puro foi isolado com rendimento de 30%.

Repetidas tentativas de síntese foram executadas utilizando a isopropilamina e a morfolina. Outras alterações, como o aumento do tempo de reação para até dias, a utilização de DMF ou

DMAP como catalisadores também foram realizadas a fim de diminuir a formação de subprodutos e melhorar os rendimentos. No entanto, constatou-se que essas modificações resultaram em uma maior formação de subprodutos na CCD.

Alguns fatores que podem ter contribuído para o insucesso dessas reações estão relacionados ao possível rearranjo que o éster ativado pode sofrer durante a reação, levando a transformação do produto em uma ureia (Figura 17). No contexto da conjugação química, a utilização da *N*-hidroxisuccinimida (NHS) previne os desdobramentos indesejados das reações (Figura 18). Em contraste, o primeiro intermediário formado (*O*-acilisoureira) pode sofrer hidrólise ou rearranjar para um produto muito menos reativo (*N*-acilureia) por meio de uma reação de troca intramolecular, sendo um caminho irreversível no qual não sintetiza a amida de relevância. Na reação em presença de NHS, o segundo intermediário se revela mais solúvel, estável e reage com a amina para gerar o produto final (DE VOS, et al., 1994; PEREIRA, et al. 2019b). Mesmo assim, entre as tentativas de obtenção da amida realizadas, a reação com o EDC/DMAP foi a mais bem-sucedida, ainda que o rendimento não atendesse o esperado.

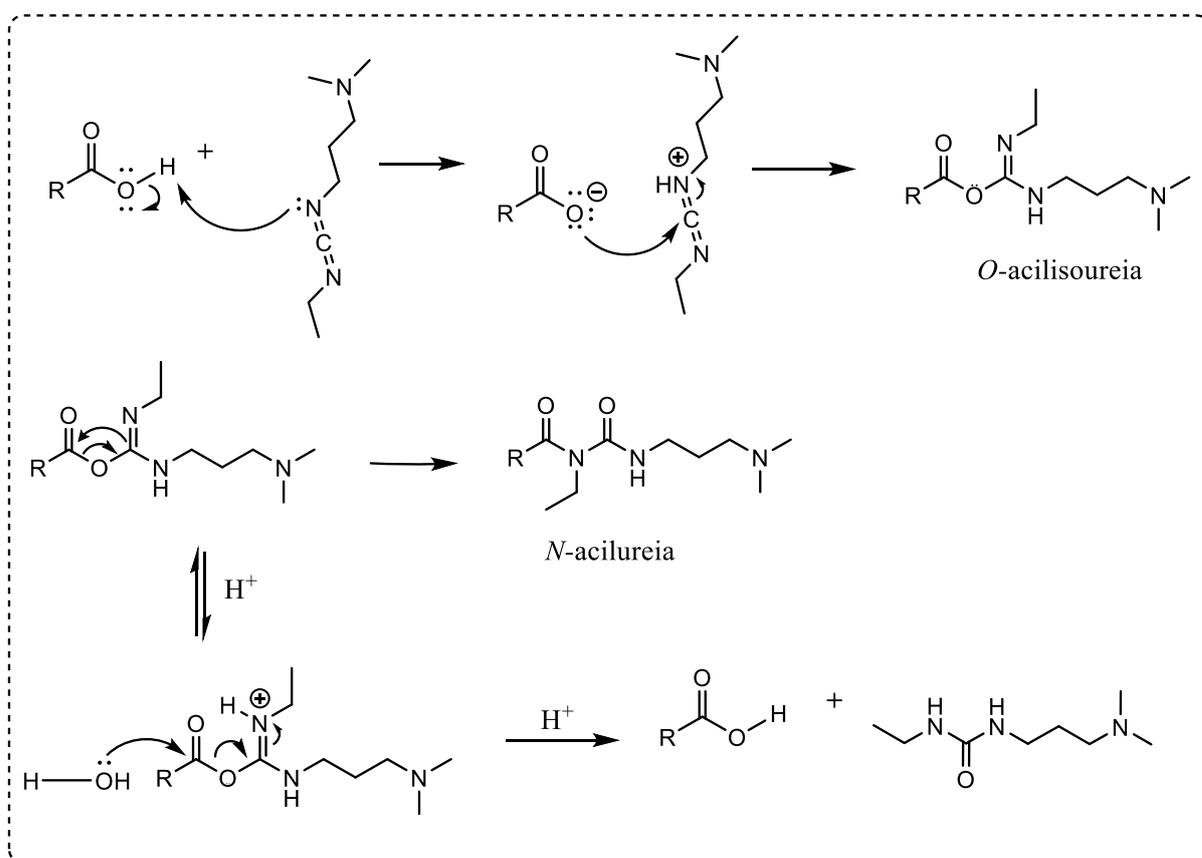


Figura 17: Proposta de mecanismo de formação da *N*-acilureia e hidrólise da *O*-acilisoureira.
Fonte: Adaptada de DUNETZ, et al., 2016.

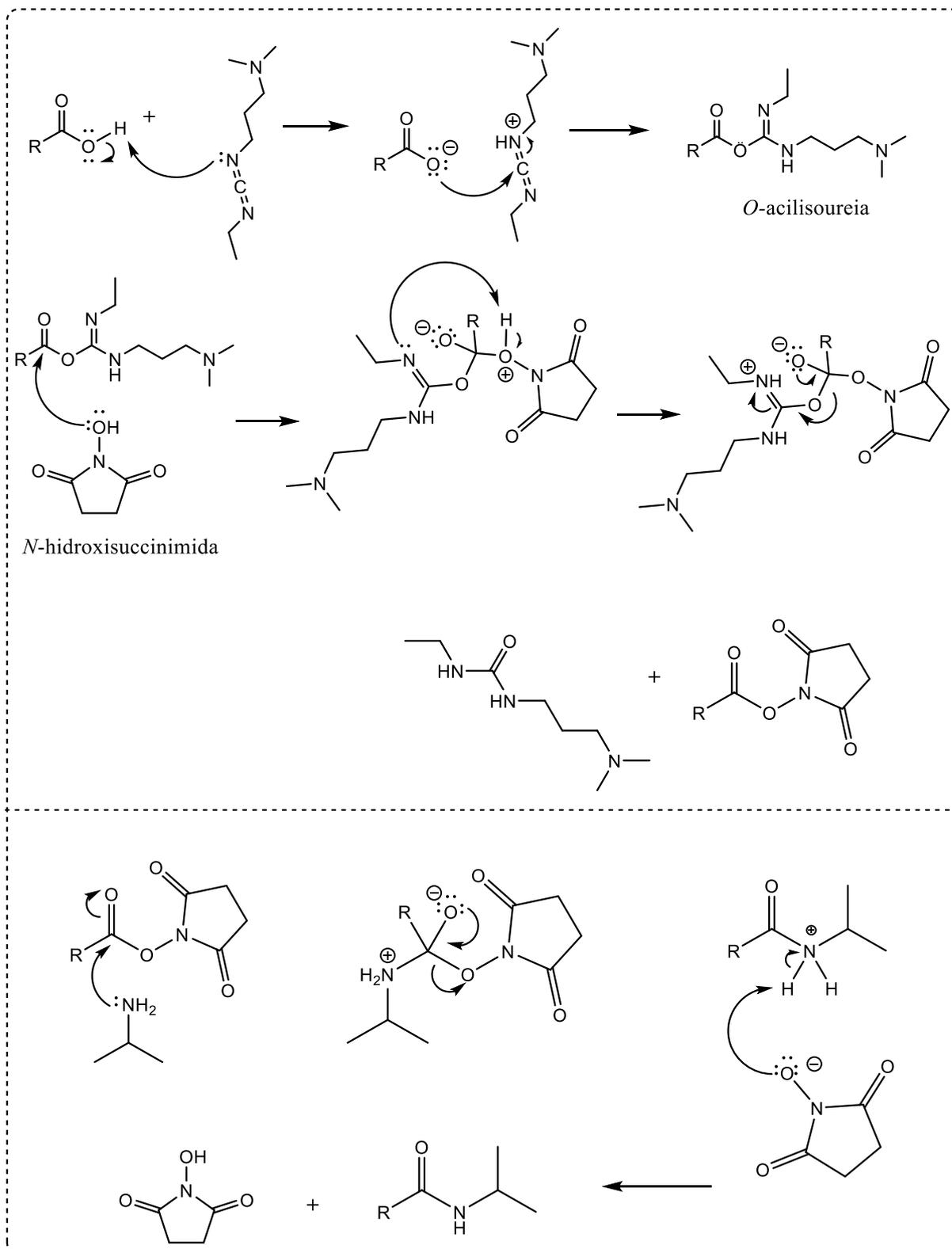


Figura 18: Proposta de mecanismo da formação da amida mediada por EDC e NHS. Fonte: Adaptada de DUNETZ, et al., 2016.

Dada a importância de obtenção desse intermediário-chave para a obtenção de derivados do MB15, reações mais eficientes são necessárias. Diversas técnicas mais modernas são descritas

na literatura para a formação de amidas. Considerando os diversos intermediários ativos derivados de ácidos carboxílicos, as espécies de éster enol têm sido exploradas como o primeiro exemplo de síntese de ligação de amida sem o uso de metais (XU, et al., 2018). Nesse método, o propiolato de metila é utilizado juntamente com acetonitrila e trietilamina em temperatura ambiente para a obtenção de diferentes amidas em uma única etapa, com rendimentos variando de 80% a 98%. A reação ocorre através de um intermediário α -acilenoléster (Figura 19). As condições suaves, tempos de reação curtos e o baixo peso molecular do reagente tornam esse método conceitualmente inovador e também atrativo do ponto de vista da química sustentável.

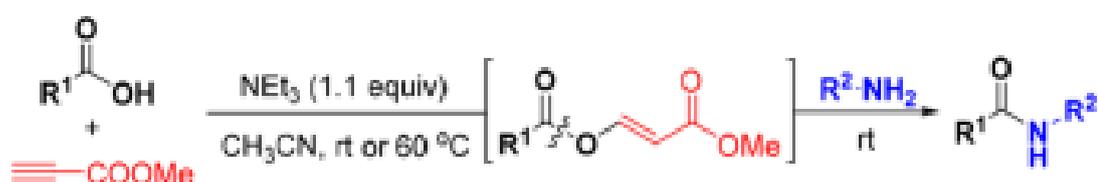


Figura 19: A condensação mediada pelo propiolato de metila. Fonte: Adaptado de XU, Xianjun et al., 2018

Outra técnica descrita por Salimiyan e colaboradores (2019) direciona o foco da reação para um mediador de acoplamento. Nessa abordagem, o 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina (TCT), atua como agente condensador, juntamente com um solvente eutéctico composto por uma mistura de ureia e cloreto de colina. A presença de trietilamina também é essencial nessa reação, pois mantém as condições de pH básico durante toda a reação (Figura 20). Essa metodologia permite a formação de amidas com rendimentos na faixa de 70% a 90% à temperatura ambiente, dentro de um tempo relativamente curto de aproximadamente 3 horas. Durante a fase de isolamento, o composto orgânico é extraído utilizando acetato de etila e posteriormente purificado por CCS.

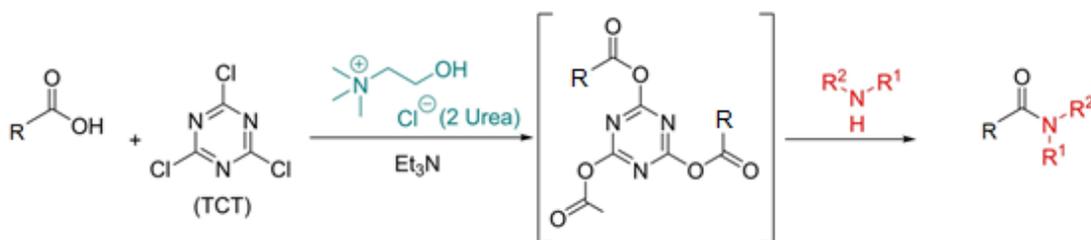


Figura 20: Formação de ligação de amida mediada por TCT entre o ácido carboxílico e amina em solventes eutécticos profundos. Fonte: Adaptada de SALIMIYAN, et al., 2019.

Além da perspectiva da utilização de outras técnicas para a obtenção das amidas, acredita-se que, em parte, o insucesso das reações esteja relacionado a capacidade dessa hidroxila competir com as amina como nucleófilo e atacar espécies eletrofílicas geradas no meio reacional. Com

isso, outro grupo protetor pode ser empregado para a hidroxila fenólica. Um dos grupos protetores mais utilizados consiste na formação de um éter benzílico com haleto de benzila (Figura 21).

Conforme descrito no trabalho de Dodo e colaboradores (2008), experimentalmente, essa reação parte da utilização de uma base, por exemplo o K_2CO_3 , que resulta na desprotonação da hidroxila fenólica. Sendo assim, o cloreto de benzila pode reagir com a hidroxila fenólica de duas maneiras diferentes: através de uma rota mais rápida (SN_2) onde não há formação de carbocátion intermediário, e através de uma rota potencialmente mais lenta (SN_1) onde um carbocátion estável pode ser formado por ressonância com o anel benzênico. Nessa interação, o grupo benzila atua como um eletrófilo e se liga ao oxigênio da hidroxila fenólica, resultando na formação do éter benzílico desejado, enquanto o cloreto atua como grupo abandonador. O produto formado evitando a reatividade indesejada da hidroxila em etapas posteriores da síntese química, assim como na formação do éter metílico. No entanto, o grupo *O*-benzila pode ser removido por hidrogenação catalítica, promovendo a quebra seletiva da ligação entre o oxigênio e o grupo benzila, regenerando a hidroxila fenólica inicial (DODO, et al., 2008).

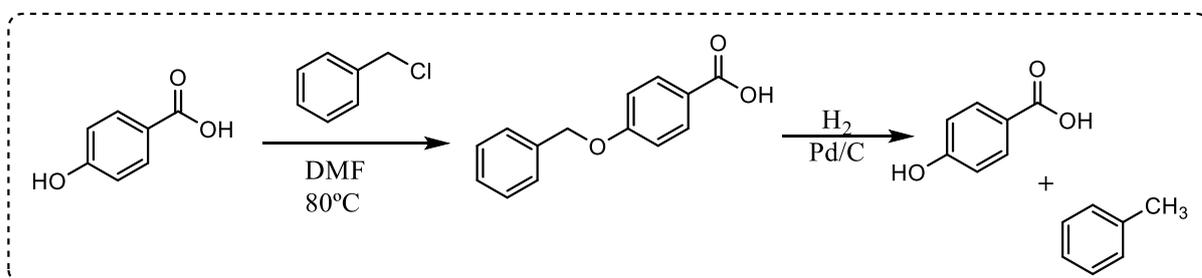


Figura 21: Rota de síntese para formação do éter benzílico a partir do cloreto de benzila
Fonte: Adaptada de DODO, et al., 2008.

4.3 Obtenção de benzilpiperidinas

Paralelamente à condução das reações para a obtenção das amidas, procedeu-se à realização de reações para obtenção de 4-hidroxibenzilpiperidinas, um segundo intermediário-chave na rota convergente para obtenção de derivados do MB15 (Figura 22). Esses intermediários consistem em um anel de 4-hidroxipiperidinas ligado por meio de uma ponte metilênica a um anel aromático onde diferentes substituintes poderiam ser explorados. Variando-se os substituintes em R_1 (Figura 16) nos reagentes de partida, de acordo com as moléculas selecionadas pela

triagem virtual, e utilizando aminas de ordem primária e secundária, realizou-se a síntese de alguns intermediários.

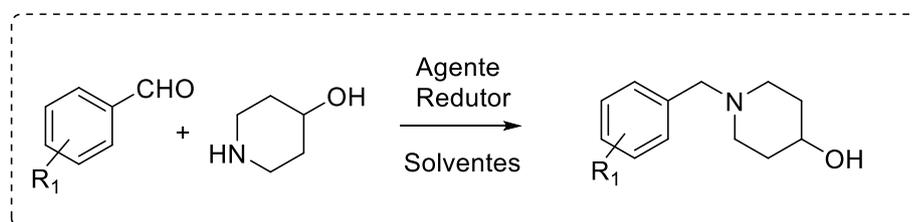


Figura 22: Rota de síntese para a obtenção da 4-hidroxi-benzilpiperidinas a partir de diferentes aldeídos aromáticos. Fonte: Autora.

Para obtenção desse intermediário, optou-se pela reação de aminação redutiva, uma reação clássica para formação de ligações C-N para obter diferentes aminas alquiladas. A reação de aldeídos ou cetonas com amônia e aminas (primárias ou secundárias) na presença de um agente redutor para obtenção de respectivas aminas, é conhecida como alquilação redutiva das aminas ou aaminação redutiva de compostos carbonílicos. Durante a reação, ocorre a formação inicial de um intermediário de adição conhecido como carbinolamina. Sob condições apropriadas, a carbinolamina sofre desidratação e se converte em uma imina. A imina, quando protonada, forma um íon imínio que, em seguida, é reduzido, resultando na formação da amina alquilada correspondente (Figura 23) (ABDEL-MAGID, et al.,1996).

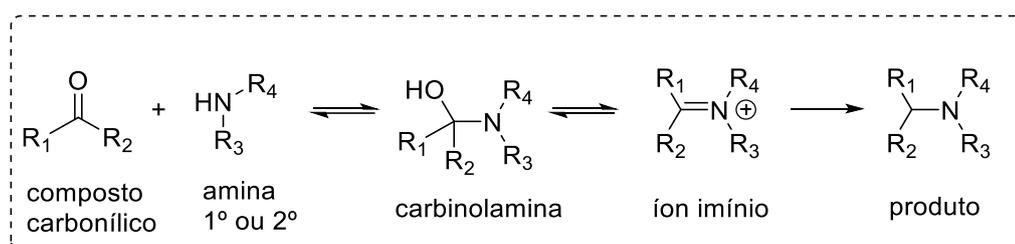


Figura 23: Sequência de intermediários formados no processo de aaminação redutiva. Fonte: Adaptada de ABDEL-MAGID, et al.,1996.

A aaminação redutiva pode ocorrer de duas maneiras distintas: reação direta e reação indireta. A reação direta, ou *one-pot*, o composto carbonílico e a amina são misturados junto com o agente redutor apropriado, sem a necessidade de formação prévia de um intermediário, como a imina ou o sal de imínio. Por outro lado, na reação indireta, ocorre a pré-formação da imina intermediária, seguida por sua redução em uma etapa separada (BAXTER et al., 2004).

Com o intuito de assegurar a formação do produto e reduzir possíveis interferências na reação, optou-se por realizar a obtenção das aminas intermediárias em duas etapas, ou seja, indiretamente. Tal decisão foi motivada por fatores relacionados às condições reacionais e ao comportamento químico dos reagentes e produtos formados, tais como a redução do aldeído ao álcool correspondente (ALVES e VICTOR, 2010).

Dessa forma, a primeira etapa do processo envolve a formação de uma imina como intermediário. Inicialmente, a amina reage com o carbono eletrofílico presente na carbonila do aldeído ou cetona. Durante essa reação, a amina doa um par de elétrons, resultando na formação de uma carbinolamina. Na etapa subsequente, o par de elétrons livre no átomo de nitrogênio da carbinolamina ataca o carbono da carbonila novamente. Isso leva a uma desidratação da molécula, resultando na formação de um íon imínio. Nesse ponto, a ligação C=N característica da imina é estabelecida (Figura 24 – A). A etapa final trata-se da adição de um agente redutor, esse é capaz de reduzir a imina formada, deslocando o equilíbrio da reação para a formação dos produtos, no caso a amina (Figura 24 – B). É importante ressaltar que vários fatores externos, como o solvente utilizado, o número de equivalentes dos reagentes, a temperatura, o pH e até mesmo fatores eletrônicos, podem influenciar o equilíbrio dessas etapas (TRIPATHI, et al., 2008).

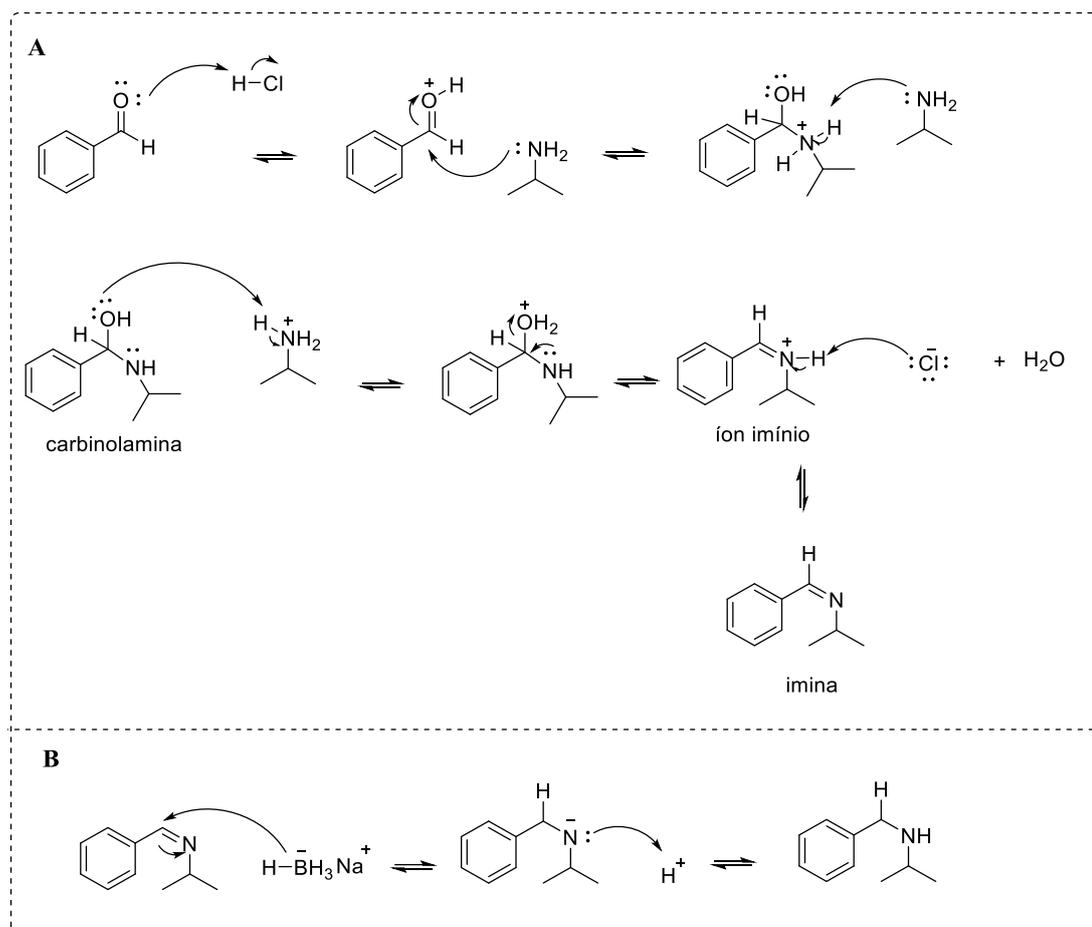


Figura 24: Proposta A: Mecanismo da primeira etapa da reação de aminação redutiva na presença de um ácido e B: Atuação simplificada do reagente NaBH_4 para redução da imina formada na etapa anteriormente. Fonte: Autora.

Com base na metodologia descrita por Pereira e colaboradores (2019a), que se mostrou apropriada considerando as condições e os materiais disponíveis, optou-se por utilizar inicialmente um aldeído aromático de estrutura simples, como o benzaldeído, junto a isopropilamina ou morfolina como amins adicionais a fim de se estabelecer as condições de reação sem consumir a 4-hidroxibenzilpiperidina, de custo mais elevado. De acordo com o mecanismo proposto na Figura 21, observa-se que a protonação da carbonila desempenha um papel fundamental na formação da imina, ao aumentar a reatividade da carbonila. No entanto, é importante considerar que pHs mais baixos diminuem a proporção da amina presente na forma de base livre, que é o nucleófilo da reação. Portanto, a faixa de pH ideal para essa reação situa-se entre 4 e 6 (LEI, et al., 2013).

Sendo assim, utilizou-se aproximadamente 10 gotas de CH_3COOH , como catalisador, para que uma proporção do composto carbonílico estivesse protonado, mantendo uma proporção da

amina como base livre. Essa abordagem mostrou-se relevante e teve um impacto significativo nos resultados, sendo observado um aumento de 40 para 76% de rendimento na formação do produto na primeira etapa da reação. Além disso, nessa primeira etapa, observou-se que a utilização de uma mistura de solvente polares (THF/metanol) proporcionava uma melhor solubilização dos reagentes de partida quando comparado com o uso diclorometano.

A formação da imina ocorre em condições de equilíbrio químico, em que a presença de água pode resultar em hidrólise e desfazer a condensação, levando à recuperação dos compostos de partida. Para garantir a conclusão da reação, é comum impulsioná-la removendo a água conforme ela é formada, deslocando o equilíbrio em favor da formação da imina. Isso pode ser alcançado por meio da adição de um agente secante ou pela aplicação de condições reativas que promovam a eliminação contínua de água, direcionando a reação para a formação completa do produto desejado (TRUPPO, 2009).

Alguns agentes desidratantes descritos, como peneiras de 3 Å e 4 Å, sulfatos metálicos (sulfato de sódio e magnésio) são empregados em aminações redutivas (TRIPATHI, et al., 2008; BAXTER et al., 2004). Nas reações realizadas, foi empregado o sulfato de sódio anidro que se tornou o reagente de escolha, devido à sua maior aplicabilidade em comparação com o uso de peneiras moleculares, uma vez que essas se desintegram facilmente nas condições de agitação, resultando na formação de partículas e comprometendo sua eficiência na remoção de água quanto nas etapas de elaboração.

Outro fator que, em tese, pode favorecer essa primeira etapa é a introdução de uma atmosfera de N₂ na reação. Essa atmosfera teria como o objetivo de reduzir a presença de água, advinda do ar atmosférico, no meio reacional, além de criar um ambiente mais propício para a etapa seguinte de redução com a remoção do oxigênio (O₂). No entanto, nesse trabalho não se observou diferença na obtenção das iminas.

O produto da primeira etapa foi utilizado sem prévia purificação na etapa de redução da imina formada. Para isso o sulfato foi filtrado em algodão, em seguida o solvente foi removido por rotavapor®, exceto quando utilizado o THF/metanol. Na etapa seguinte, de redução da imina formada, a escolha do agente redutor é um fator essencial para o sucesso reação, uma vez que este deve reduzi-la seletivamente. A redução não seletiva do composto carbonílico de partida, uma vez que a reação se encontra em equilíbrio, leva a obtenção do álcool correspondente (MURUGESAN, et al., 2020).

Os agentes redutores a base de boro promove essa redução, fornecendo íons hidreto para a adição nucleofílica ao grupo carbonila/imina. Isso resulta na formação de um intermediário alcóxi-hidreto por adição nucleofílica do hidreto. Em seguida, o intermediário alcóxido complexado com o boro é protonado em meio ácido, através da transferência de um próton para o oxigênio, resultando na formação do álcool correspondente, conforme mecanismo mostrado na Figura 25 (ALVES e VICTOR, 2010).

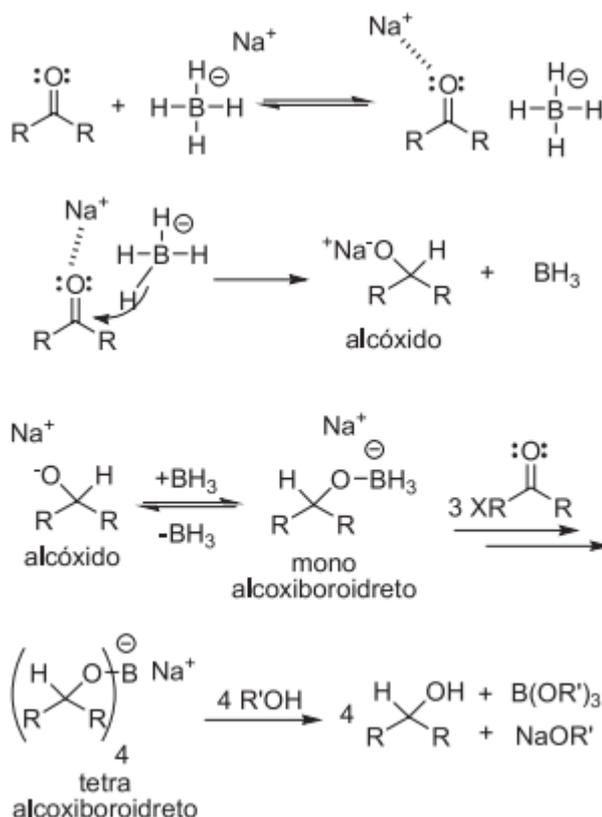
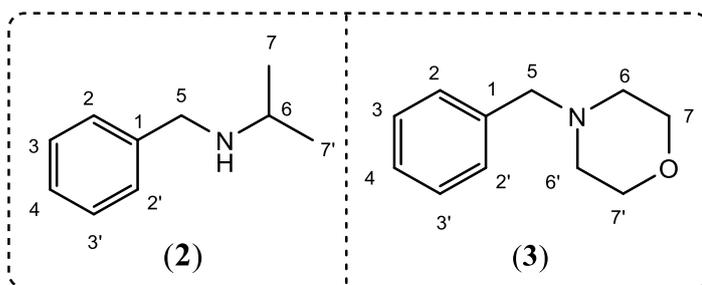


Figura 25: Mecanismo proposto para redução de carbonílicos com NaBH₄. Fonte: ALVES e VICTOR, 2010.

O borohidreto de sódio (NaBH₄) é um agente redutor forte conhecido por também reduzir rapidamente iminas, além do grupo carbonila em aldeídos e cetonas, o que faz com que sua aplicação seja limitada, pois reduz esses grupos presentes na mesma molécula (TRIPATHI, et al., 2008). Conseqüentemente, para eliminar a possibilidade de qualquer outro grupo carbonila ser reduzido em uma etapa de síntese é sempre essencial que o grupo carbonila seja completamente convertido em imina. Com base nisso, acredita-se que a utilização do NaBH₄ nas reações tenha sido o motivo dessas apresentarem rendimentos razoáveis (12,5% a 40% de rendimento), somada a presença de subprodutos, evidenciado por CCD.

Utilizando a metodologia descrita por Pereira e colaboradores (2019a), a obtenção dos intermediários de interesse **(2)** e **(3)** foi realizada e ambas as substâncias sintetizadas foram caracterizadas por ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C e os espectros estão apresentados no ANEXO 1-B e C respectivamente.



No espectro de RMN de ^1H da *N*-benzilpropan-2-amina **(2)**, os sinais correspondentes aos hidrogênios aromáticos foram registrados como um multipeto de integral para cinco hidrogênios em 7,4-7,28 ppm. Os hidrogênios referentes aos grupos metila provenientes da amina, foram registrados como um dupeto de integral igual a seis em 1,15 ppm e uma constante de acoplamento de 6,6 Hz. O sinal 2,90 ppm referente a H-6 foi observado como hepteto de integral para um hidrogênio com constante de acoplamento também de 6,6 Hz, condizente com o acoplamento com os hidrogênios das metilas. Por fim, o H-5, referente aos hidrogênios metilênicos que confirma a formação do produto, foi registrado como um simpleto em 3,82 ppm de integral para dois hidrogênios.

No espectro de RMN de ^{13}C , foram observados sinais referentes aos carbonos aromáticos na faixa de 139 a 127 ppm. Já os carbonos C-7 e C-7', oriundos da isopropilamina, foram registrados em 22,4 ppm, enquanto C-6 foi registrado em 48,1 ppm. O carbono C-5, que confirma a redução do composto carbonílico, foi registrado em 51,1 ppm. Além disso, através do experimento DEPT-135, é possível observar esse sinal em fase negativa, confirmando se tratar de um carbono metilênico.

No espectro de RMN de ^1H da 4-benzilmorfolina **(3)**, também é observado um simpleto referente ao H-5 em 3,55 ppm, com integral para dois hidrogênios, confirmando que houve a formação do produto desejado. Além dele, são observados os sinais correspondentes aos hidrogênios aromáticos (7,35 a 7,28 ppm) e os hidrogênios referentes ao anel de morfolina: um tripleto aparente de integral igual a quatro em 3,75 ppm, atribuído ao hidrogênio H-7 e H-7',

em 2,50 ppm um simpleto largo de integral igual a quatro, atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-6'.

No espectro de RMN de ^{13}C , o mesmo padrão de sinais de (2) é observado, exceto os sinais referentes a porção da molécula proveniente da amina, onde os carbonos C-7 e C-7' foram registrados em 66,7 ppm devido a proximidade ao oxigênio e os carbonos C-6 e C-6' foram registrados em 53,4 ppm, menos desblindados, pela proximidade ao nitrogênio, menos eletronegativo. O carbono C-5, que confirma a redução do composto carbonílico, foi registrado em 63,3 ppm.

Apesar do relativo sucesso na obtenção dessas duas aminas, a obtenção do álcool benzílico como subproduto foi observado por análise por CCD, comparando o produto final com um padrão do álcool benzílico, e confirmada pelo espectro de RMN de ^{13}C (Figura 26) e ^1H (Figura 27). Os sinais entre 126-140 ppm são referentes aos carbonos aromáticos, no entanto, é observado um sinal em 65,2 ppm, compatível com um carbono alifático vizinho a um oxigênio. Adicionalmente não são observados sinais referentes aos carbonos da amina, nem a um carbono carbonílico, indicando que o aldeído foi reduzido a álcool. O espectro com os sinais referentes aos hidrogênios revela os aromáticos na faixa de 7,42-7,29 ppm e em 4,71 ppm o carbono alfa a hidroxila alcóolica confirmando a presença do álcool benzílico.

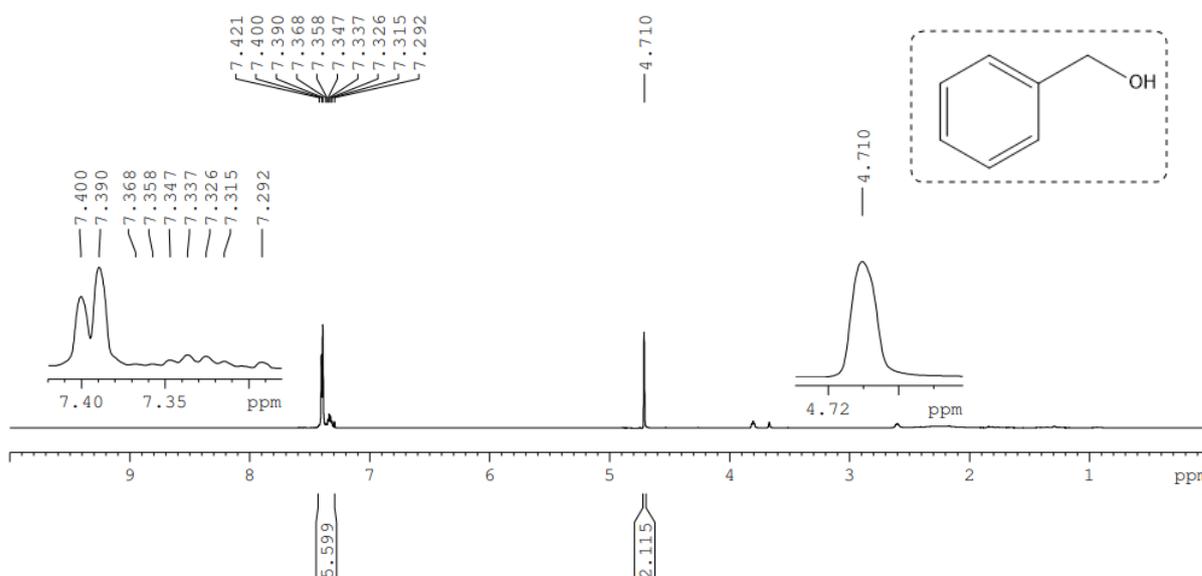


Figura 26: Espectro de RMN de ^1H do álcool benzílico. Fonte: Autora.

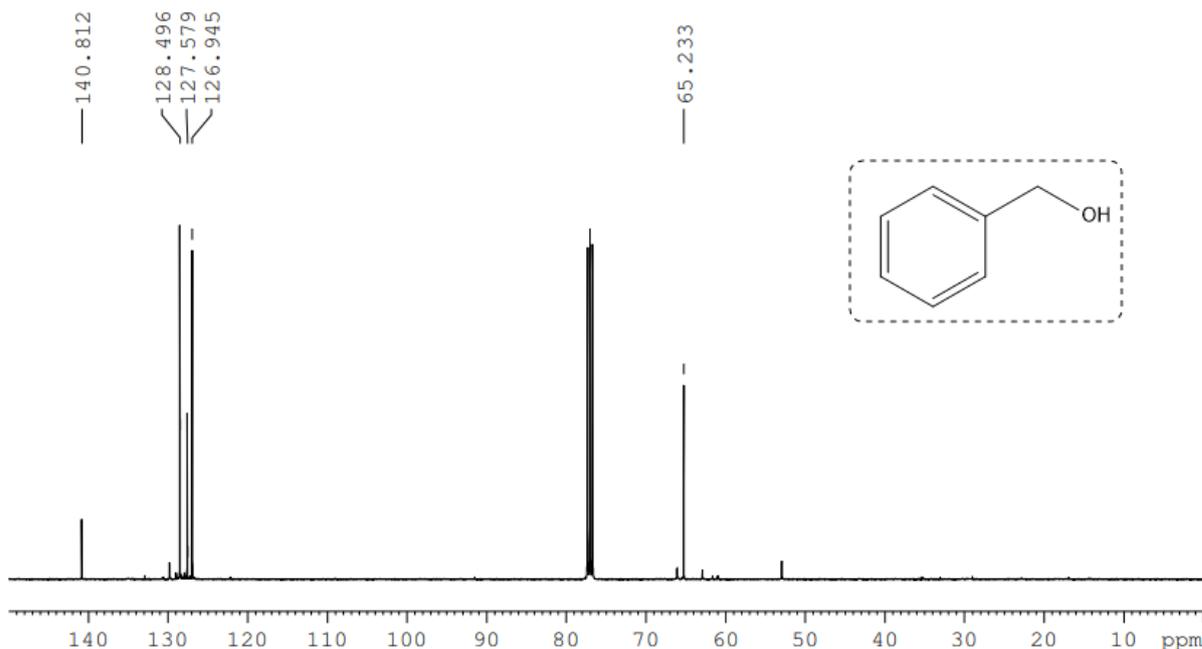


Figura 27: Espectro de RMN de ^{13}C do álcool benzílico. Fonte: Autora.

Sendo assim, adotou-se, uma estratégia de marcha química na elaboração da reação, na qual a acidificação do meio reacional foi realizada ao término da reação, visando garantir que a amina formada migrasse para a fase aquosa, enquanto o álcool era removido na fase orgânica. Posteriormente, a alcalinização da fase aquosa foi realizada para que a amina ficasse na forma de base livre, possibilitando a sua maior partição na fase orgânica e consequente extração utilizando acetato de etila como solvente.

Após estabelecer as condições reacionais iniciais, mas observando a formação do álcool, outra metodologia foi explorada, conforme descrito por Tripathi e colaboradores (2008). Essa abordagem propõe melhorias nas condições de reação, como a utilização do cianoborohidreto de sódio (NaCNBH_3). Esse agente redutor tem sido amplamente utilizado com notável seletividade e estabilidade, que permite uma redução direta, conveniente ao procedimento de aminação redutiva. A vantagem do redutor reside em sua estabilidade em soluções ácidas relativamente fortes ($\text{pH} = 3$) e em sua solubilidade em solventes hidroxílicos, como álcoois. Porém, as limitações associadas ao método são reações mais lentas, que demandam um excesso de amina, e que muitas vezes podem gerar subprodutos altamente tóxicos como cianeto, levando a formação de HCN , por exemplo, durante a elaboração da reação (BAXTER et al., 2004; TRIPATHI, et al., 2008).

A reação foi realizada utilizando o 3,4-difluorbenzaldeído e o 4-hidroxipiperidina que compõem a estrutura do MB15 e seria fundamental no desenvolvimento da pesquisa como parte do controle positivo nos futuros ensaios biológicos. Teoricamente, os dois átomos de flúor ligados ao anel aromático, posicionados em meta e *para* contribuem com efeito indutivo retirador de densidade eletrônica que leva a polarização da ligação C=O do grupo aldeído, tornando o carbono carbonílico mais suscetível ao ataque nucleofílico pela amina presente. Sendo assim, a reação feita de forma indireta, utilizando aproximadamente 10 gotas de ácido acético glacial e dessa vez optando por um agente redutor mais seletivo. Assim, obteve-se o produto na forma de um semissólido oleoso com 76,8% de rendimento de produto bruto. Apesar da observação de vários subprodutos em análise por CCD, este foi purificado por CCS, utilizando uma mistura de hexano e acetato de etila (7:3 \rightarrow 1:1), ao final obteve-se aproximadamente 25 mg de um produto cuja análise de RMN de ^1H (Figura 28) e ^{13}C mostrou uma complexidade devido a presença de diversos sinais, tornando difícil a identificação do produto (4).

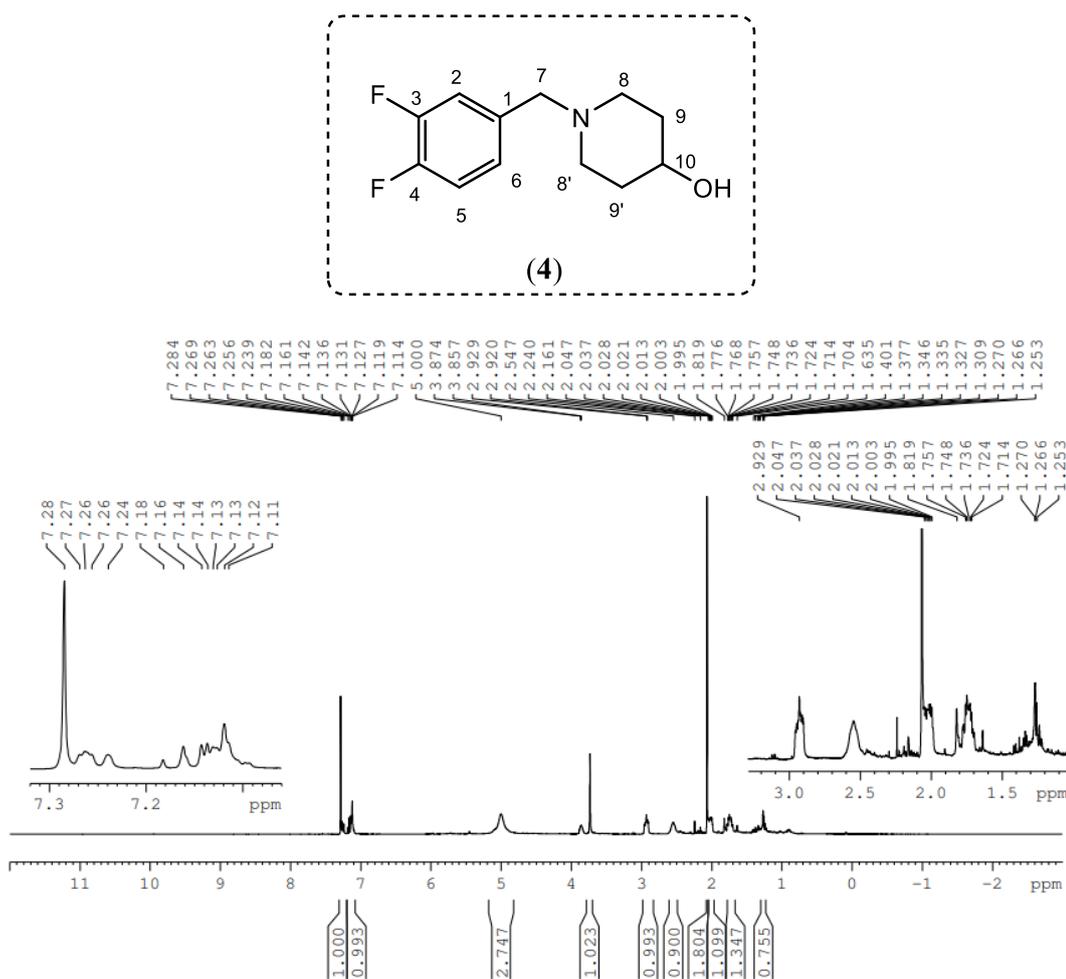


Figura 28: Espectro de RMN de ^1H da 1-(3,4-difluorbenzil)piperidin-4-ol. Fonte: Autora.

Entretanto, pelo espectro de RMN de ^{13}C (Figura 29), pode-se observar sinais referentes aos carbonos aromáticos na faixa de 151-117 ppm. Mais especificamente C-1 em 131,5 ppm, os carbonos C-3 e C-4 foram atribuídos aos sinais em, 151,6 e 149,1 ppm, respectivamente, o que está de acordo com o efeito de desblindagem causada pelo átomo de flúor, apresentado também uma constante 1J no valor de 247,0 Hz, característico do acoplamento de ^{13}C -F. Igualmente, esses sinais foram confirmados como de carbonos não hidrogenados por sua ausência no experimento DEPT-135 (Figura 30). O sinal em 126,1 ppm é atribuído a C-6, já os demais carbonos do anel aromático foram observados em 118,8 e 117,4 ppm atribuídos, respectivamente, aos carbonos C-2, C-5, com um 2J de 17,5 Hz referente ao acoplamento referente a ligação ^{12}C -C-F, adicionalmente, todos hidrogenados de acordo com o experimento DEPT-135. Dentre as impurezas presente pode-se atribuir o sinal em 176,1 ppm seja referente ao carbono carbonílico do ácido acético residual dessa reação, como também o sinal em 21,6 ppm referente ao grupo metil do ácido. Os deslocamentos químicos menores que 70 ppm, com o auxílio do subespectro DEPT-135, foram atribuídos ao carbono benzílico C-7 (60,6 ppm) e C-10 (65,7 ppm) referente ao carbono alfa à hidroxila, indicando que a amina foi, de fato, formada. Os demais sinais de maior intensidade, atribuídos aos carbonos C-8 e C-8' (49,4 ppm) e C-9 e C-9' (32,4 ppm) do anel de 4-hidroxipiperidina, todos registrados em fase inversa, no subespectro DEPT-135.

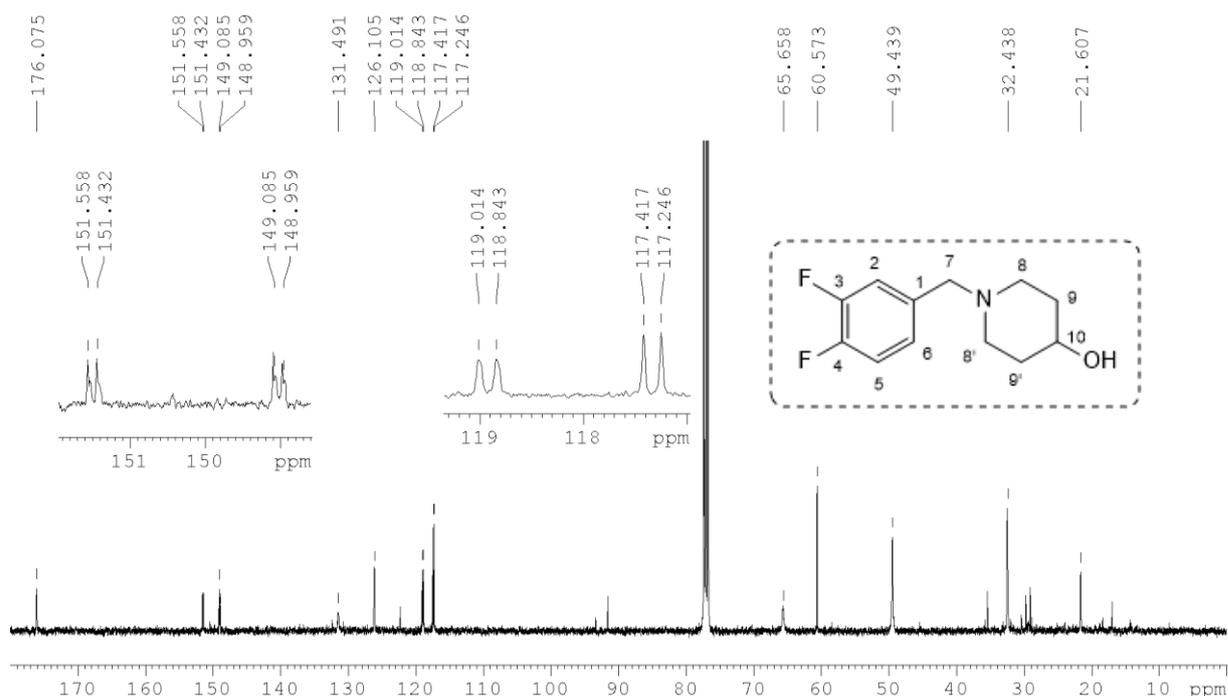


Figura 29: Espectro de RMN de ^{13}C da 1-(3,4-difluorobenzil)piperidin-4-ol. Fonte: Autora.

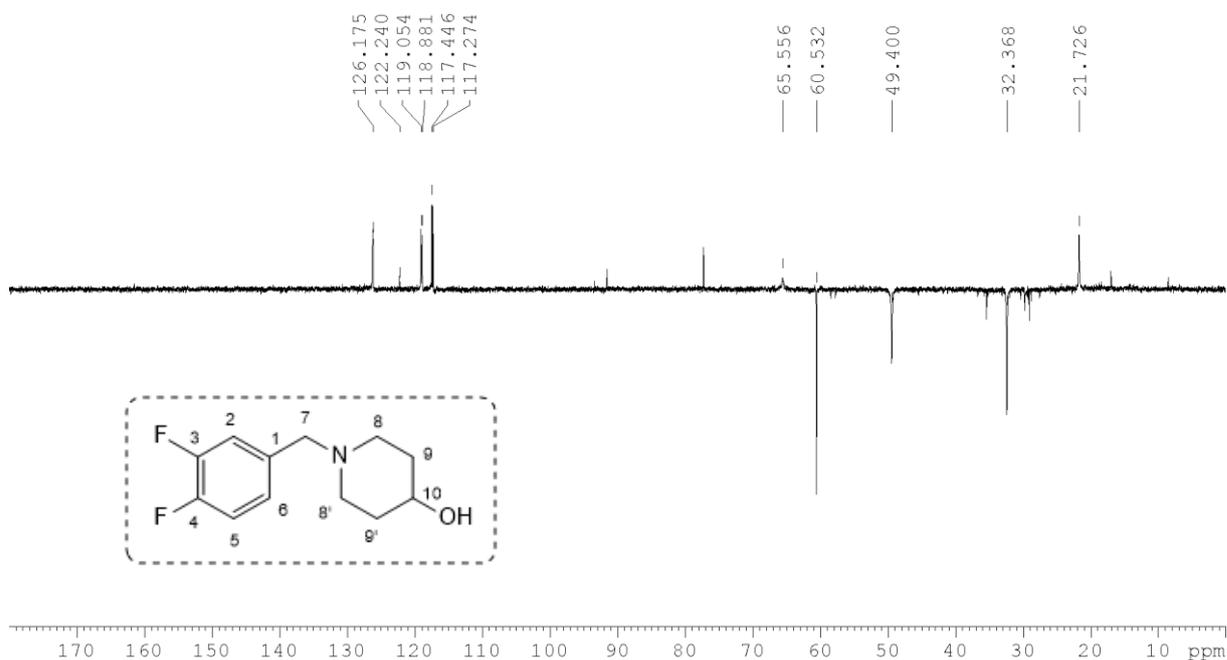


Figura 30: Subespectro DEPT-135 da 1-(3,4-difluorbenzil)piperidin-4-ol. Fonte: Autora.

Assim, é possível afirmar que os resultados obtidos indicaram, de maneira encorajadora, a formação do produto desejado, marcando um passo promissor na obtenção do intermediário-chave necessário para avançar nas próximas etapas do trabalho. Além disso, foi viável identificar algumas condições reacionais mais promissoras a partir dos rendimentos alcançados durante a síntese conforme descrito na Tabela 5. É importante ressaltar, entretanto, que a técnica empregada carece de ajustes nas condições experimentais, elaboração e/ou purificação, a fim de se obter o produto de maneira mais pura e com rendimentos melhores.

Tabela 5: Resumo das melhores condições reacionais estabelecidas na reação de aminação redutiva. Fonte: Autora.

	Maiores rendimentos	Menores rendimento
Ácido acético	Presença	Ausência
Solventes	THF e Metanol	Diclorometano
Agente secante	Sulfato de sódio anidro	Peneira molecular
Agente redutor	NaCNBH ₃	NaBH ₄

5 CONCLUSÃO

O planejamento sintético inicial para a obtenção dos análogos planejados sofreu modificações ao longo da pesquisa, em razão das dificuldades enfrentadas durante a execução das reações, de forma que várias rotas de síntese alternativas foram propostas. A utilização de hidroxibenzilamidas como intermediários-chave ofereceu oportunidades para a exploração de múltiplas modificações. Apesar dos desafios na obtenção do cloreto de ácido desejado e a instabilidade de certos intermediários, o que revela a complexidade das reações envolvidas. A estratégia de proteção da hidroxila fenólica por meio da formação de um éter benzílico se mostrou promissora, sugerindo a possibilidade de superar as reatividades indesejadas em etapas subsequentes da síntese.

Entretanto, a busca por métodos alternativos e mais eficientes de síntese, como os mencionados na literatura, apresenta caminhos para a superação dos desafios enfrentados. A adoção de técnicas inovadoras e condições mais otimizadas pode levar a uma maior eficiência nas etapas de acoplamento e formação de amidas, contribuindo para a obtenção bem-sucedida dos derivados desejados. Assim como nas reações de aminação redutiva, onde se foi possível obter 3 possíveis intermediários planejados na rota, que além de serem revelados na caracterização por RMN de ^{13}C e ^1H , serviram de modelo para o entendimento e análise de diversas condições reacionais.

Embora o prazo de execução do projeto não tenha permitido concluir todas essas otimizações desejadas, os resultados obtidos são animadores. A estabelecimento dessa rota, até então inexplorada, abre portas para a obtenção de análogos do MB15, relevantes para a construção de uma relação estrutura-atividade desse padrão estrutural inovador na busca por fármacos tripanocidas. A pesquisa realizada não apenas contribui para o conhecimento da química sintética, mas também destaca a importância da experimentação, adaptação e exploração de novas metodologias para superar os desafios encontrados. Assim, a continuidade do trabalho, aproveitando os aprendizados dessa fase inicial, é encorajada.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MAGID, Ahmed F. *et al.* Reductive amination of aldehydes and ketones with sodium triacetoxyborohydride: studies on direct and indirect reductive amination procedures. **The Journal of organic chemistry**, v. 61, n. 11, p. 3849-3862, 1996.
- ALARCÓN DE NOYA, Belkisyole *et al.* Chagas disease expands its epidemiological frontiers from rural to urban areas. **Frontiers in Tropical Diseases**, v. 3, p. 799009, 2022.
- ALVES, Péricles B.; VICTOR, Mauricio M. Reação da cânfora com boroidreto de sódio: uma estratégia para o estudo da estereoquímica da reação de redução. **Química Nova**, v. 33, p. 2274-2278, 2010.
- ANG, Kenny KH *et al.* Mining a cathepsin inhibitor library for new antiparasitic drug leads. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 5, p. e1023, 2011.
- ARIFIN, Budi; TANG, Dumas Flis; ACHMADI, Suminar Setiati. Transformation of eugenol and safrole into hydroxychavicol. **Indonesian Journal of Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 77-85, 2015.
- ARNAL, Audrey *et al.* Estimating the current burden of Chagas disease in Mexico: A systematic review and meta-analysis of epidemiological surveys from 2006 to 2017. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 4, p. e0006859, 2019.
- BAVETSIAS, Vassilios *et al.* Aurora isoform selectivity: design and synthesis of imidazo [4, 5-b] pyridine derivatives as highly selective inhibitors of Aurora-A kinase in cells. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 22, p. 9122-9135, 2013.
- BAXTER, Ellen W.; REITZ, Allen B. Reductive aminations of carbonyl compounds with borohydride and borane reducing agents. **Organic reactions**, v. 59, p. 1-714, 2004.
- BERMUDEZ, José *et al.* Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta tropica**, v. 156, p. 1-16, 2016.
- BMC, Medicine. Putting Chagas disease on the global health agenda. **BMC medicine**, v. 21, n. 1, p. 188, 2023.
- BRAK, Katrien *et al.* Identification of a new class of nonpeptidic inhibitors of cruzain. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 20, p. 6404-6410, 2008.

BRAGA, Saulo Fehelberg Pinto *et al.* Synthesis and biological evaluation of potential inhibitors of the cysteine proteases cruzain and rhodesain designed by molecular simplification. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 25, n. 6, p. 1889-1900, 2017.

BRASIL, Ministério da Saúde., DataSUS. Sistema de Informações sobre Mortalidade. 2022.

CHAO, Chen; LEONE, José L.; VIGLIANO, Carlos A. Chagas disease: Historic perspective. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 5, p. 165689, 2020.

CLAYDEN, Jonathan; GREEVES, Nick; WARREN, Stuart. **Organic chemistry**. Oxford University Press, USA, 2012.

COSTA, Milce *et al.* Doença de chagas: uma revisão bibliográfica. **Revista Eletrônica da Faculdade Evangélica de Ceres**, v. 2, n. 1, 2013.

COURA, José Rodrigues; VIÑAS, Pedro Albajar; JUNQUEIRA, Angela CV. Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, p. 856-862, 2014.

CORREIA, Jennifer Rodrigues *et al.* Doença de Chagas: aspectos clínicos, epidemiológicos e fisiopatológicos. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 13, n. 3, p. e6502-e6502, 2021.

DA SILVA, Ana Clara; DE VASCONCELOS, Isabela Patrícia; NOVA, Isabella Coimbra Vila. Mecanismo de ação dos antiparasitários no Trypanosoma Cruzi e sua interação com a célula hospedeira. **Revista Universitária Brasileira**, v. 1, n. 5, 2023.

DA SILVA FILHO, José Damiano *et al.* Perfil hematológico e bioquímico de pacientes com doença de Chagas atendidos por um serviço de atenção farmacêutica no estado do Ceará. **Journal of Health & Biological Sciences**, v. 5, n. 2, p. 130-136, 2017.

DODO, Kosuke *et al.* Antiproliferative and apoptosis-inducing activities of alkyl gallate and gallamide derivatives related to (-)-epigallocatechin gallate. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 16, n. 17, p. 7975-7982, 2008.

DE ANDRADE, Jadelson Pinheiro *et al.* I Diretriz Latino-Americana para o diagnóstico e tratamento da cardiopatia chagásica: resumo executivo. **Arq Bras Cardiol**, v. 96, n. 6, p. 434-442, 2011.

DE OLIVEIRA, Silmara Ferreira *et al.* Epidemiologia da doença de chagas aguda no nordeste brasileiro. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 6, p. e10310615190-e10310615190, 2021.

DE SOUZA MACÊDO, Thaís Lemos *et al.* Análise do perfil epidemiológico da Doença de Chagas no Brasil. Período entre 2001 e 2018. **Revista de Saúde**, v. 12, n. 3, p. 42-49, 2021.

DE SOUZA, Sabrinna Barbosa *et al.* Perfil epidemiológico da doença de Chagas aguda na região norte do Brasil no ano de 2015-2019. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 13, n. 7, p. e8200-e8200, 2021.

DE VOS, Sicco *et al.* Synthesis and characterization of poly (acrylamide)-graft-poly (ethylene oxide-co-propylene oxide). **Polymer**, v. 35, n. 12, p. 2644-2650, 1994.

ETTARI, Roberta *et al.* Synthesis and biological evaluation of novel peptidomimetics as rhodesain inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 6, p. 1184-1191, 2016.

FERNANDES, Anna Luísa Barbosa *et al.* Incidência e prevalência da doença de chagas no Brasil. **CIPEEX**, v. 2, p. 978-983, 2018.

FONSECA, Keila Cardoso Barbosa. **Influência da poluição do ar no remodelamento miocárdico na doença de Chagas em modelo experimental**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2020.

GONÇALVES, William *et al.* Caracterização epidemiológica das mortes por doença de Chagas ocorridas no Brasil no período de 2010 a 2019. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e592101019096-e592101019096, 2021.

GUARNER, Jeannette. Chagas disease as example of a reemerging parasite. In: **Seminars in diagnostic pathology**. WB Saunders, 2019. p. 164-169.

GUEDES, Paulo Marcos Matta *et al.* Inflammation enhances the risks of stroke and death in chronic chagas disease patients. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. e0004669, 2016.

HOTEZ, Peter J. The rise of neglected tropical diseases in the "new Texas". **PLOS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 1, p. e0005581, 2018.

HYATT, Stephen M. *et al.* On the intractability of estrogen-related receptor α as a target for activation by small molecules. **Journal of medicinal chemistry**, v. 50, n. 26, p. 6722-6724, 2007.

KAISER, Marcel *et al.* Repurposing of the open access malaria box for kinetoplastid diseases identifies novel active scaffolds against trypanosomatids. **Journal of biomolecular screening**, v. 20, n. 5, p. 634-645, 2015.

KAWAGUCHI, Wilton Hideki *et al.* Doença de Chagas: do surgimento ao tratamento—revisão da literatura. **J Health Sci Inst**, v. 37, n. 2, p. 182-9, 2019.

KRATZ, Jadel M. *et al.* The translational challenge in Chagas disease drug development. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 117, p. e200501, 2022.

LANA, Marta; TAFURI, Washington Luiz; BARTHOLOMEU, D. C. Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas. **Parasitologia humana**, v. 11, p. 85-108, 2005.

LASCANO, Fernanda; GARCÍA BOURNISSEN, Facundo; ALTCHEH, Jaime. Review of pharmacological options for the treatment of Chagas disease. **British journal of clinical pharmacology**, v. 88, n. 2, p. 383-402, 2022.

LEI, Qian *et al.* Fast reductive amination by transfer hydrogenation “on water”. **Chemistry—A European Journal**, v. 19, n. 12, p. 4021-4029, 2013.

LIMA, R. S. *et al.* Chagas disease: a bibliographic update. **Revista brasileira de análise clínica**, v. 51, n. 2, p. 103-106, 2019.

MANNE-GOEHLER, Jennifer *et al.* Estimating the burden of Chagas disease in the United States. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 11, p. e0005033, 2016.

MARÍN, Pedronel Araque; SOTO-OSPINA, Alejandro. Redox mechanism of Trypanosoma cruzi resistance to nitro prodrugs Benznidazole and Nifurtimox. **Int. J. Bioinforma. Comput. Biol**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2020.

MCKERROW, J. H.; MCGRATH, M. E.; ENGEL, J. C. The cysteine protease of Trypanosoma cruzi as a model for antiparasite drug design. **Parasitology Today**, v. 11, n. 8, p. 279-282, 1995.

MALONE, Cody J. *et al.* A rapid review on the efficacy and safety of pharmacological treatments for Chagas disease. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 6, n. 3, p. 128, 2021.

MOREIRA, Diogo Rodrigo Magalhaes *et al.* Conformational restriction of aryl thiosemicarbazones produces potent and selective anti-*Trypanosoma cruzi* compounds which induce apoptotic parasite death. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 75, p.467-478. 2014.

MONTALBETTI, Christian AGN; FALQUE, Virginie. Amide bond formation and peptide coupling. **Tetrahedron**, v. 61, n. 46, p. 10827-10852, 2005.

MURUGESAN, Kathiravan *et al.* Catalytic reductive aminations using molecular hydrogen for synthesis of different kinds of amines. **Chemical Society Reviews**, v. 49, n. 17, p. 6273-6328, 2020.

NEISES, Bernhard; STEGLICH, Wolfgang. Simple method for the esterification of carboxylic acids. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 17, n. 7, p. 522-524, 1978.

NISIMURA, Lindice Mitie *et al.* Effect of Posaconazole in an in vitro model of cardiac fibrosis induced by *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 238, p. 111283, 2020.

OLIVEIRA, Angélica Porto de *et al.* O viver do portador chagásico crônico: possibilidades de ações do enfermeiro para uma vida saudável. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, v. 31, p. 491-498, 2010.

OLIVEIRA, Maiara de S. *et al.* A novel platinum complex containing a piplartine derivative exhibits enhanced cytotoxicity, causes oxidative stress and triggers apoptotic cell death by ERK/p38 pathway in human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells. **Redox Biology**, v. 20, p. 182-194, 2019.

PANFILOV, A. V. *et al.* Sodium borohydride in reductive amination reactions. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 34, n. 2, p. 76-78, 2000.

PARRA-HENAO, Gabriel *et al.* In search of congenital Chagas disease in the Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 3, p. 482, 2019.

PATTERSON, Stephen; WYLLIE, Susan. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 6, p. 289-298, 2014.

PEREIRA, Glaécia AN *et al.* Discovery and characterization of trypanocidal cysteine protease inhibitors from the 'malaria box'. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 179, p. 765-778, 2019a.

PEREIRA, Goreti *et al.* (Bio) conjugation strategies applied to fluorescent semiconductor quantum dots. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, p. 2536-2561, 2019b.

PEREIRA-SILVA, Fernanda Sant'Ana; MELLO, Marcio Luiz Braga Corrêa de; ARAÚJO-JORGE, Tania Cremonini de. Doença de Chagas: enfrentando a invisibilidade pela análise de histórias de vida de portadores crônicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 27, p. 1939-1949, 2022.

PATTABIRAMAN, Vijaya R.; BODE, Jeffrey W. Rethinking amide bond synthesis. **Nature**, v. 480, n. 7378, p. 471-479, 2011.

ROBICHAUD, André; AJJOU, Abdelaziz Nait. First example of direct reductive amination of aldehydes with primary and secondary amines catalyzed by water-soluble transition metal catalysts. **Tetrahedron letters**, v. 47, n. 22, p. 3633-3636, 2006.

ROCHA, Debora A. *et al.* Synthesis and structure-activity relationship studies of cruzain and rhodesain inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 157, p. 1426-1459, 2018.

RISHTON, Gilbert M. Nonleadlikeness and leadlikeness in biochemical screening. **Drug discovery today**, v. 8, n. 2, p. 86-96, 2003.

SANTOS, Daniele Rodrigues *et al.* DOENÇA DE CHAGAS UMA REVISÃO INTEGRATIVA. **Revista JRG de Estudos Acadêmicos**, v. 5, n. 10, p. 01-15, 2022.

SANTOS, Valéria Regina Cavalcante dos *et al.* Acute Chagas disease in the state of Pará, Amazon Region: is it increasing?. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, p. e170298, 2018.

SAAVEDRA, Joseph E. Reductive alkylation of beta.-alkanolamines with carbonyl compounds and sodium borohydride. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 50, n. 13, p. 2271-2273, 1985.

SALIMIYAN, Kimiya; SABERI, Dariush. Choline Chloride/Urea as an Eco-Friendly Deep Eutectic Solvent for TCT-Mediated Amide Coupling at Room Temperature. **ChemistrySelect**, v. 4, n. 14, p. 3985-3989, 2019.

SOLOMONS, T. W. Graham; FRYHLE, Craig. **Química Orgânica**, v. 2. São Paulo: LTC, 2006.

SILVA, Fernanda Sant'Ana Pereira *et al.* **Vivendo com Chagas: registro de histórias de vida e atividades de educação não formal com portadores de Doença de Chagas**. Tese de Doutorado. 2019.

SILVA, Monique Adriani Garcia da. **Síntese de inibidores da cisteína protease cruzaina e estudo de relação estrutura-atividade**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2021.

SOUSA, Camila Viana de. **Construção e aplicação de um protocolo de triagem virtual no desenvolvimento de potenciais inibidores da cruzaina**. Monografia. Universidade Federal de Ouro Preto. 2021.

TURK, Boris. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. **Drug discovery**, v. 5, n. 9, p. 785-799, 2006.

TRIPATHI, Rama P. *et al.* Recent development on catalytic reductive amination and applications. **Current Organic Chemistry**, v. 12, n. 13, p. 1093-1115, 2008.

TRUPPO, Matthew David. **Rapid screening and process development of biocatalytic reactions**. The University of Manchester (United Kingdom), 2009.

ULIJN, Rein V. *et al.* A single aqueous reference equilibrium constant for amide synthesis–hydrolysis. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, n. 5, p. 1024-1028, 2002.

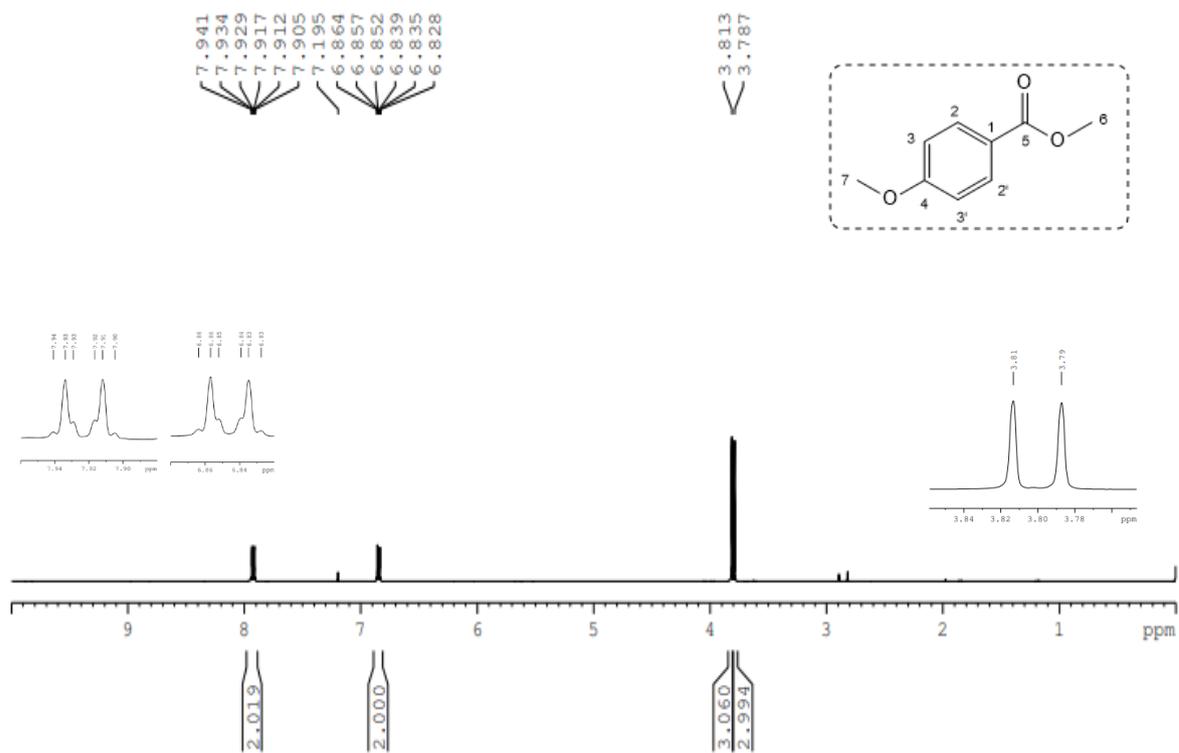
VALEUR, Eric; BRADLEY, Mark. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p. 606-631, 2009.

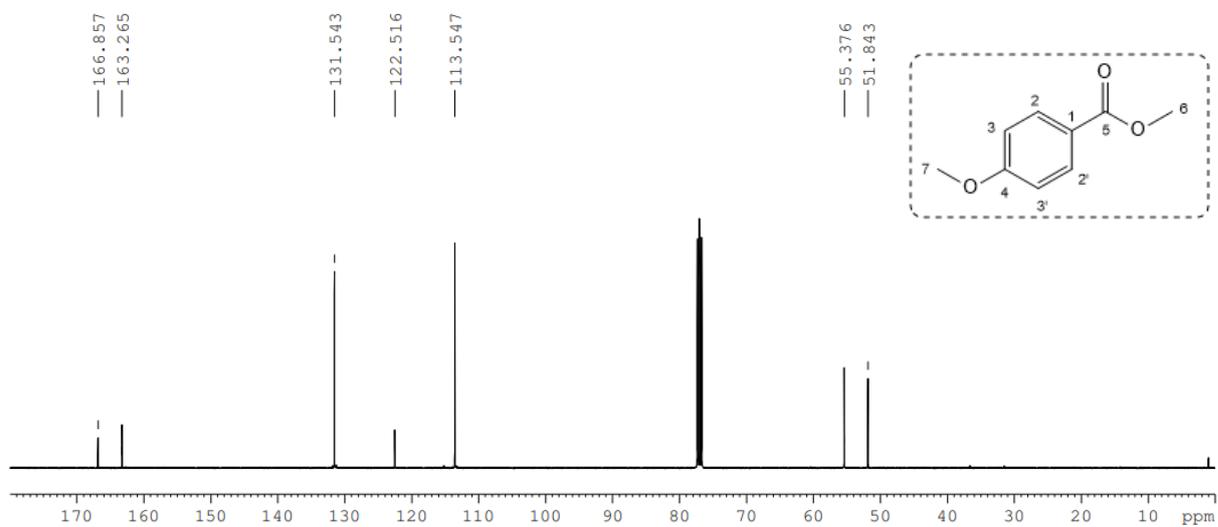
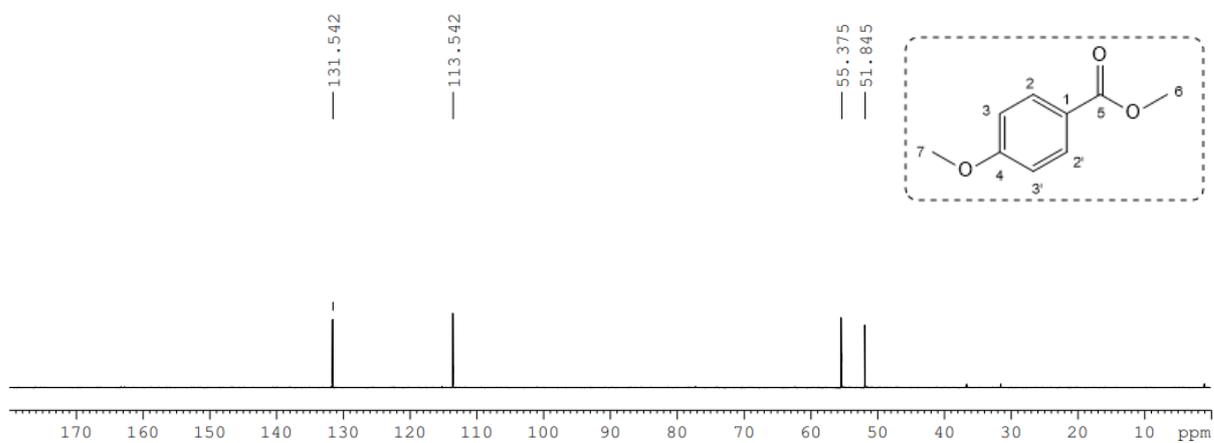
XU, Xianjun *et al.* Direct amidation of carboxylic acids through an active α -acyl enol ester intermediate. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 83, n. 15, p. 7962-7969, 2018.

WHO - **World Health Organization**. World Chagas Disease Day 2023 to focus on integrating universal care and surveillance at the primary care level. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/14-04-2023-world-chagas-disease-day-2023-to-focus-on-integrating-universal-care-and-surveillance-at-the-primary-care-level>. Acesso em: 10 jul. 2023.

ANEXO I

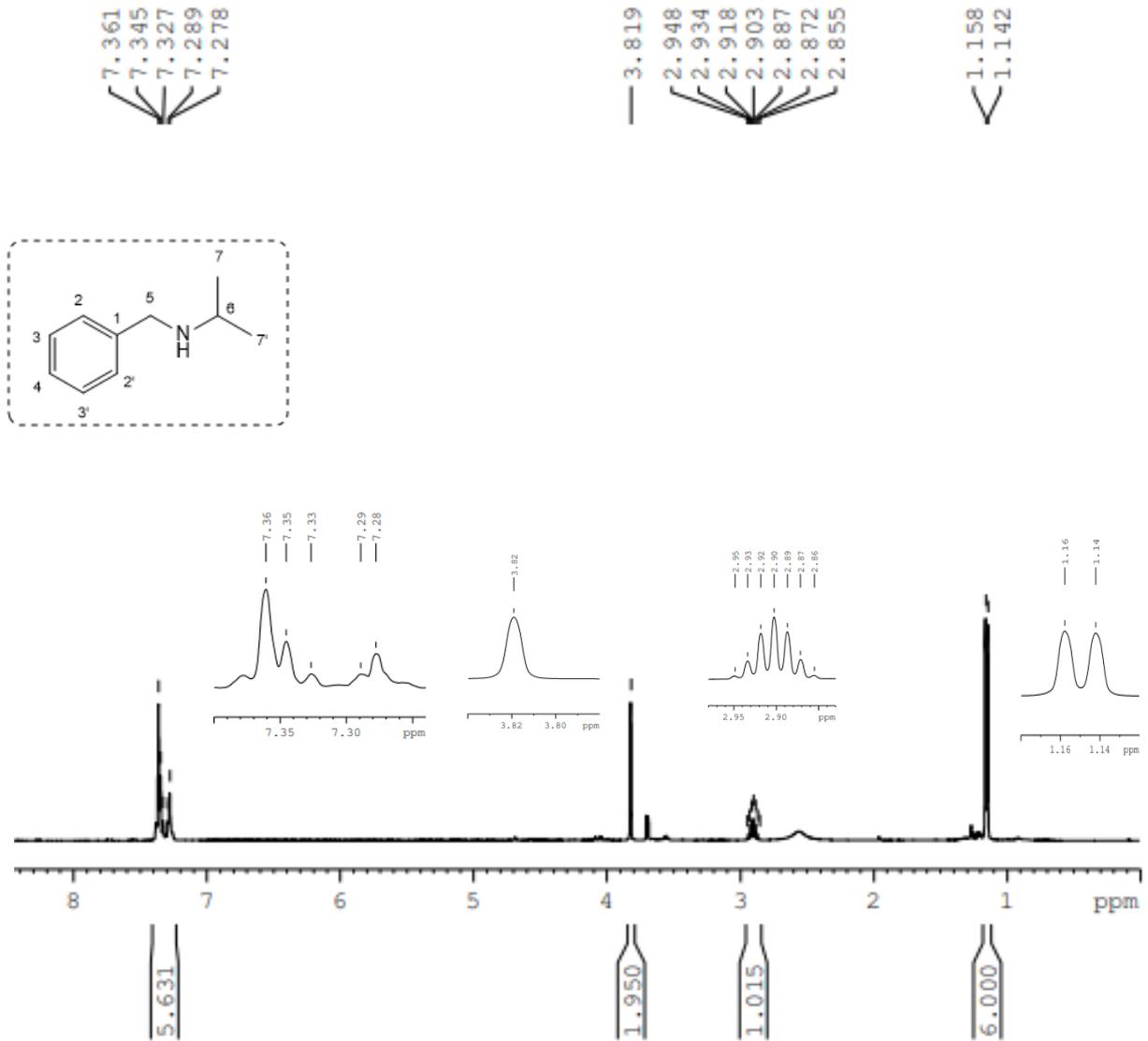
A – Espectros de RMN do 4-metoxibenzoato de metila

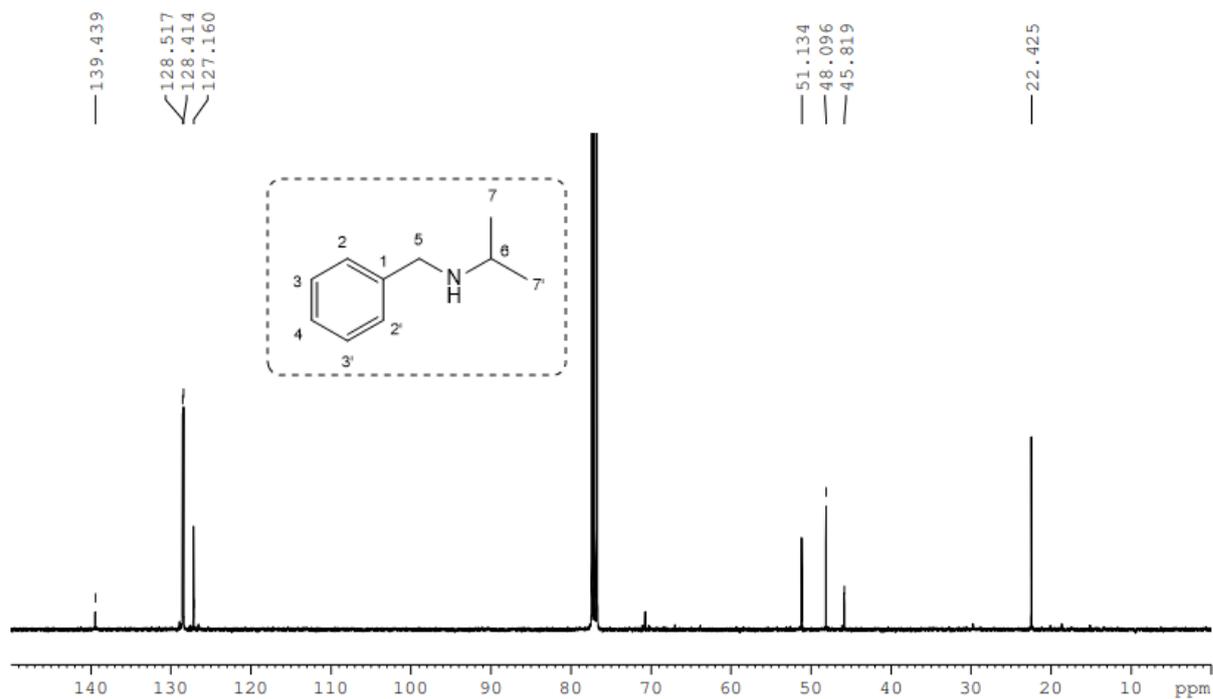
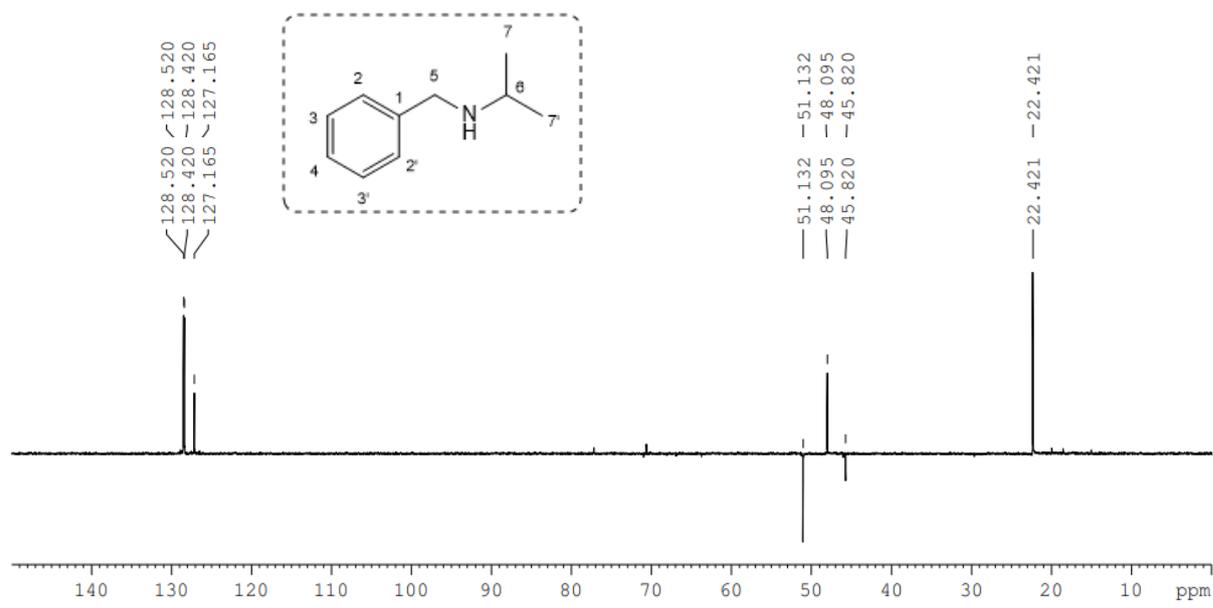
A.1 – Espectro de ^1H (CDCl_3 – 400 MHz)

A.2 – Espectro ^{13}C (CDCl_3 – 100 MHz)A.3 – Subespectro DEPT-135 (CDCl_3 – 100 MHz)

B – Espectros de RMN da *N*-benzilpropan-2-amina

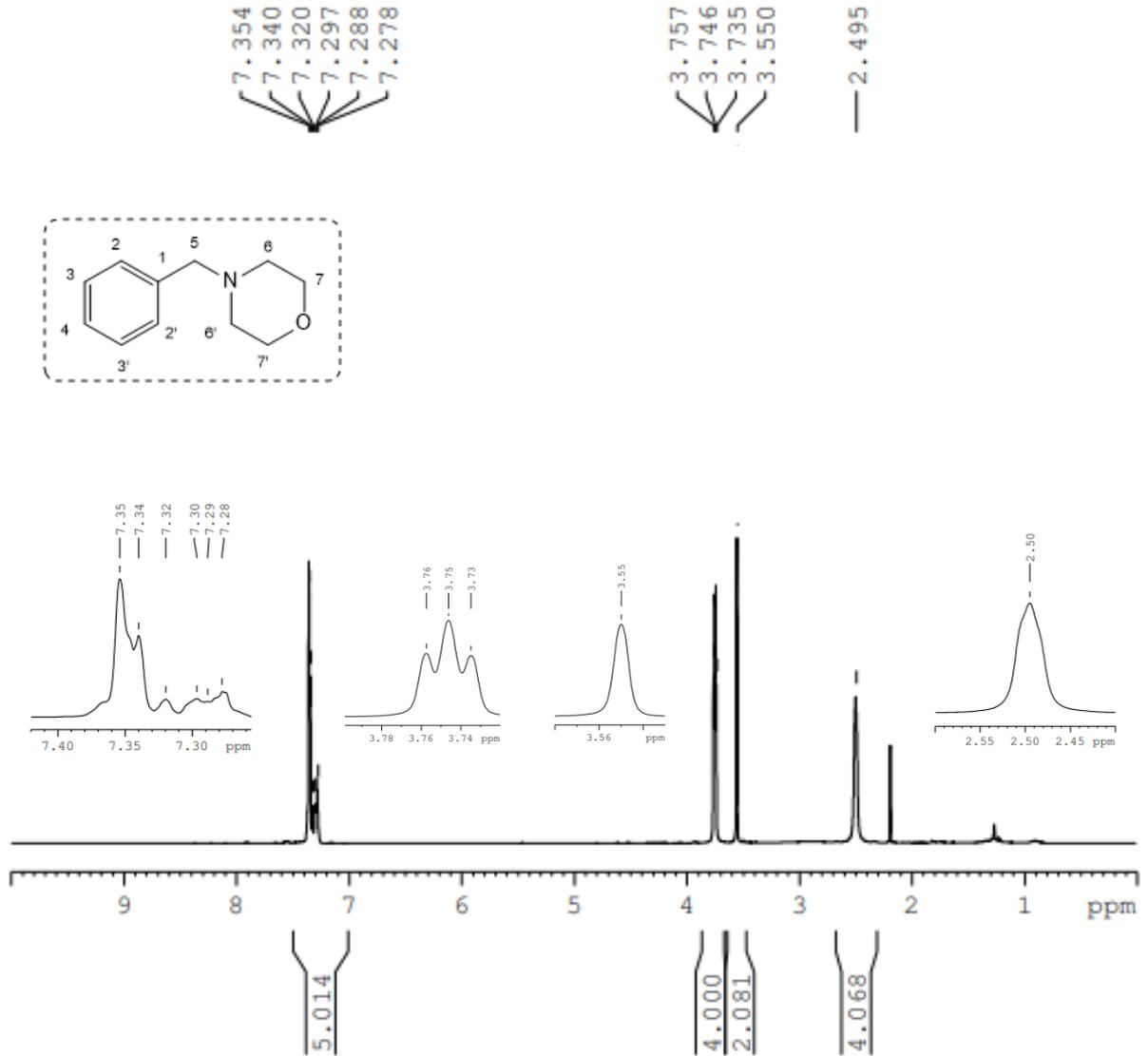
B.1 – Espectro de ^1H (CDCl_3 – 400 MHz)

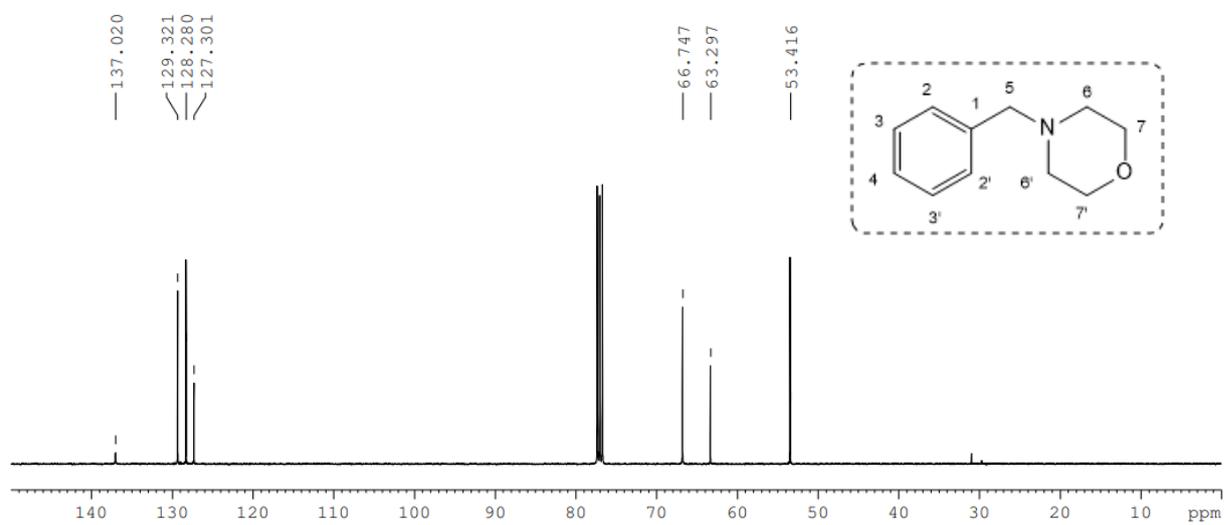


B.2 – Espectro ^{13}C (CDCl_3 – 100 MHz)B.3 – Subespectro DEPT-135 (CDCl_3 – 100 MHz)

C – Espectros de RMN da 4-benzilmorfolina

C.1 – Espectro de ^1H (CDCl_3 – 400 MHz)



C.2 – Espectro ^{13}C (CDCl_3 – 100 MHz)C.3 – Subespectro DEPT-135 (CDCl_3 – 100 MHz)